

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2010

Suvi Laakso

RINTASYÖVÄN DIAGNOSTISET MÄÄRITYSMENETELMÄT



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Suvi Laakso

RINTASYÖVÄN DIAGNOSTISET MÄÄRITYSMENETELMÄT

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää herkkä määrittymenetelmä rintasyövän diagnosointiin soluista vapautuvalle prostata-spesifiselle antigeenille (PSA). Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston biolääketieteen laitoksella ja se oli osa laajempaa EU-projektia. Työssä käytettiin analyttinä PSA:ta, jonka pitoisuus on koholla eturauhassyövän yhteydessä, mutta tutkimukset ovat osoittaneet sitä löytyneen rintasyövän yhteydessä naisilla.

Työssä vertailtiin kahta eri menetelmää ja niiden herkkyyksiä havaita PSA:ta. Heterogeenisessä, ei-kilpailevassa määrittymessä vasta-aine H117 sitoutuu mikrotiitterilevyn kaivon pohjaan. Vasta-aineeseen sitoutuu PSA ja tähän sitoutuu toinen vasta-aine 5A10, joka on sitoutunut europiumilla leimattuun nanopalloon. Tässä muodostuu nk. sandwich. Ainoastaan sitoutuneiden kompleksien fluoresenssi mitataan, joten menetelmä vaatii pesuja välissä, jotta sitoutumaton aine saadaan pois. Saatu fluoresenssisignaali oli suoraan verrannollinen analyytin määrään.

Toinen menetelmä, jota tutkittiin, oli kaksoisfotoniviritykseen perustuva menetelmä TPX. TPX-teknologia perustuu polymeeristen mikropallojen käyttöön kiintokantajana reaktiossa ja fluoresoivien molekyylien kaksoisfotoniviritykseen rajatussa kolmiulotteisessa fokuksessa. Tässä fluoresoivana aineena käytettiin BF530-väriä. Tässä menetelmässä vasta-aineella H117 koutattuihin mikropalloihin liittyi analytti PSA, johon liittyi vasta-aine 5A10, joka oli sitoutunut BF530:lla värjättyyn nanopalloon. Ainoastaan sitoutuneet kompleksit mitattiin TPX-laitteella. Analyytin määrä oli suoraan verrannollinen mittauksessa saatavaan fluoresenssisignaaliin.

Menetelmien herkkyyttä parannettiin optimoimalla käytettyjen vasta-aineiden ja mikropallojen määrä sekä puskuri. Määrittymiset tehtiin solun kasvatusmediasta otetuille näytteille, joten työssä tutkittiin, miten eri solun kasvatusmediumit ja solutiheydet vaikuttavat menetelmän herkkyyteen.

ASIASANAT:

rintasyöpä, nanopartikkelit, ei-kilpaileva immunomäärittäminen, TPX-teknologia

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

Autumn 2010 | Total number of pages: 47

Supervisors: Harri Härmä, Ph.D.; Ilari Suominen, Ph.D.

Suvi Laakso

DIAGNOSTIC ASSAYS FOR BREAST CANCER

The aim of this thesis was to develop a sensitive assay for breast cancer detection. The project was carried out at the Faculty of Medicine of the University of Turku as part of a larger EU study. The analyte in this study was PSA. Its concentration in blood is elevated when a person has been diagnosed with prostatic cancer but according to recent studies, blood PSA levels are also elevated in some women with breast cancer.

Two different methods were used in this thesis. In a heterogenic, non-competitive assay the primary antibody H117 binds to the bottom of a microtitration plate well. PSA binds to this antibody and the secondary antibody 5A10 which is bound to europium-labeled nanoparticles binds to the PSA. These form a so called sandwich. Only the fluorescence of the bound complexes is measured so this method requires washes during the procedure to remove the unbound material. The received fluorescence is directly proportional to the amount of the analyte.

The other examined method was based on TPX technology. This technology is based on the use of microspheres as solid-phase reaction carrier and on two-photon excitation of fluorescent molecules which takes place only within the three-dimensional focal volume. The fluorescent agent in this method was BF530. PSA was bound to the microspheres coated with antibody H117. This complex was then bound to the nanospheres coated with antibody 5A10 and labeled with BF530. Only the bound complexes were measured using a TPX fluorometer. The amount of the analyte was directly proportional to the received fluorescence signal.

The sensitivity of the methods was improved by optimizing the amounts of the antibodies and microspheres used. The buffers used were compared and the one that gave the best signals was selected. The assays were made from the samples obtained from the medium of the cells. Thus, the effects of the different cell-culture media and cell concentration on the sensitivity of the methods were studied.

KEYWORDS:

breast cancer, nanoparticles, non-competitive immunoassay, TPX technology

1	JOHDANTO	6
2	IMMUNOMÄÄRITYSMENETELMIÄ	7
2.1	Nanopartikkelit	7
2.2	Heterogeeninen, ei-kilpaileva immunomääritys	8
2.3	Kaksoisfotoniviriteinen fluoresenssi	10
3	RINTASYÖPÄ	12
3.1	Rintasyövän toteaminen	12
3.2	Merkkiaineet	13
3.2.1	PSA	14
4	MENETELMÄT	15
4.1	Fluoresenssi	15
4.1.1	Fluoresenssileimat	17
4.2	Bioaffiniteetti	18
5	MATERIAALIT	19
5.1	Biotiini	19
5.2	Streptavidini	20
5.3	Europium	20
5.4	BF530-leima	21
6	MÄÄRITYKSET	22
6.1	Heterogeeninen, ei kilpaileva immunomääritys	22
6.1.1	Komponenttien optimointi	23
6.1.2	Komponenttien vaikutus menetelmän herkkyyteen	25
6.2	TPX-menetelmä	27
6.2.1	Komponenttien optimointi	28
7	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	31
7.1	Heterogeeninen, ei-kilpaileva immunomääritys	31
7.2	TPX-menetelmä	39

8 POHDINTA

43

LÄHTEET

44

LIITTEET

- LIITE 1. PSA:n määrän vaikutus signaaliin.
LIITE 2. Eu-leimattujen, 5A10-päällystettyjen nanopallojen määrän optimointi.
LIITE 3. Biotinoidun vasta-aineen H117 määrän optimointi.
LIITE 4. Puskurin vaikutus signaaliin.
LIITE 5. Mediumin määrän vaikutus signaaliin.
LIITE 6. Solumäärän vaikutus signaaliin.
LIITE 7. LnCap-solujen mediumin standardit ja näytteet. (20 % ja 50 %)
LIITE 8. LnCap-solujen mediumin standardit ja näytteet. (20 %)
LIITE 9. Vasta-aineen H117 ja 5A10 määrän optimointi.
LIITE 10. Mikropallojen toiminnan testaus.
LIITE 11. Puskurin vaikutus signaaliin ja BF530-leimattujen nanopallojen määrä.
LIITE 12. TPX-menetelmän kinetiikka, kun käytettiin BF530-leimattua vasta-ainetta.
LIITE 13. TPX-menetelmän kinetiikka, kun käytettiin BF530-leimattuja nanopalloja
LIITE 14. TPX-menetelmän standardit ja LnCap-solunäyte.

KUVAT

- Kuva 1. Ei-kilpailevan immunomäärityksen periaate. 9
Kuva 2. Ei-kilpailevan immunomäärityksen standardikäyrä. 10
Kuva 3. Yksittäisten mikropallojen mittaus kaksoisfotoniviritteisellä fluorometrillä. 11
Kuva 4. Jablonskin energiatasodiagrammi. 16
Kuva 5. Stokesin siirtymä. 17
Kuva 6. Biotiinin kemiallinen rakenne. 19
Kuva 7. Heterogeenisen määrityksen periaate. 22
Kuva 8. a) TPX-menetelmän periaate, jossa käytettiin BF530-leimattua vasta-ainetta.
b) TPX-menetelmän periaate, jossa käytettiin BF530-leimattua mikropalloa. 28
Kuva 9. Puskurien vertailu. 32
Kuva 10. RPMI-mediumin vaikutus signaaliin. 33
Kuva 11. DMEM-mediumin vaikutus signaaliin. 33
Kuva 12. A549-solujen signaalien suhde. 34
Kuva 13. LnCap-solujen signaalien suhde. 35
Kuva 14. A549-solujen standardisuorat, kun mediumia oli 20 % ja 50 %. 36
Kuva 15. LnCap-solujen standardisuorat mediumpitoisuuksilla 20 % ja 50 %. 36
Kuva 16. A549-solujen mediumin standardisuora (20 % mediumia). 37
Kuva 17. LnCap-solujen mediumin standardisuora (20 % mediumia). 38
Kuva 18. TPX-menetelmän kinetiikka, kun käytettiin BF530-värjättyä
vasta-ainetta 5A10 sekä BF530-värjättyä nanopalloja 40
Kuva 19. TPX-menetelmän standardisuora, kun käytettiin
BF530-värjättyä nanopalloja.. 41

1 JOHDANTO

Rintasyöpää voidaan diagnosoida monella eri tavalla, esimerkiksi palpaatiolla, mammografialla ja neulanäytteellä. Nykyisin neulanäytteitä otettaessa käytetään yleensä paksua neulaa, jotta saadaan tarpeeksi näytettä tutkittavaksi. Opinnäytetyön tarkoituksena onkin kehittää uudentyyppinen tapa diagnosoida rintasyöpää. Tämä perustuisi prostataspesifisen antigeenin (PSA) detektioon. PSA on seriiniproteaasi, jota tuottaa lähinnä eturauhanen, jonka vuoksi PSA:ta esiintyy korkeina konsentraatiopitoisuuksina siemennesteessä. (1) Ihmisen veressä PSA:ta on miljoona kertaa pienempänä pitoisuutena, joten sen detektioon tarvitaan hyvin herkkä menetelmä. (2) Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että kohonnut PSA-pitoisuus naisilla saattaa viitata rintasyöpään. Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston biolääketieteen laitoksella ja se oli osa suurempaa EU-projektia, jota tehdään yhteistyössä Tukholmassa sijaitsevan Karolinska Institutin kanssa. Projektiin kuuluu osana saman tekniikan soveltaminen eturauhassyövän diagnosoinnissa (Karolinska Institut), mutta opinnäytetyö kattaa ainoastaan rintasyövän diagnosointiin perustuvan osan.

Nanopartikkeleita voidaan käyttää apuna PSA:n havainnoinnissa. Ne voidaan leimata jollakin tietyllä aineella, esim. europium-kelaatilla, joka on helpompi havaita, koska niillä on korkea fluoresenssi-intensiteetti. Nämä vasta-aineella pinnoitetut nanopartikkelit sitoutuvat antigeeniin ja niiden avulla voidaan määrittää muiden aineiden pitoisuuksia seoksissa, esimerkiksi seerumissa.

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää herkempi menetelmä, kuin mitä nykyisin on saatavilla, rintasyövän diagnosoinnille, jotta näytteenotossa voitaisiin aina käyttää ohutneulaa paksun neulan sijaan. Tämä parantaisi huomattavasti potilaiden mukavuutta, koska neula olisi ohuempi ja näytettä tarvittaisiin vähemmän. Myös syöpäsolujen leviämistä voidaan vähentää ohutneulanäytteenoton avulla, koska kudosta rikkoutuu entistä vähemmän pienentäen riskiä vapauttaa syöpäsoluja verenkiertoon.

2 IMMUNOMÄÄRITYSMENETELMIÄ

Immunomääritysmenetelmiä käytetään määrittämään analyyttia biologisissa nesteissä ja se koostuu vähintään kahdesta vaiheesta. Nämä vaiheet ovat analyytin ja vasta-aineen välinen reaktio sekä immunoreaktion tuotteiden havainnointi, jotta voidaan määrittää läsnä olevan analyytin määrä. (3) Immunomääritykset voidaan jakaa eri tavoin kahteen ryhmään; homogeeniseen ja heterogeeniseen määrittämiseen, kilpailevaan ja ei-kilpailevaan määrittämiseen tai leimattuun ja ei-leimattuun määrittämiseen. (4)

2.1 Nanopartikkelit

Nanopartikkeleilla tarkoitetaan yleensä hiukkasia, jotka ovat kooltaan nanometrialueella (tyypillisesti 1-100 nm). (5) Nämä partikkelit voivat olla mistä tahansa aineesta, esimerkiksi metalleista, puolijohteista tai orgaanisista polymeereistä. (6)

Jos verrataan nanopartikkelien ja samasta materiaalista olevien suurempien kappaleiden ominaisuuksia, huomataan niiden eroavan toisistaan hyvinkin paljon. Nanopartikkeleilla on esimerkiksi elektronisia, optisia ja katalyyttisiä ominaisuuksia, joita ei muilla kappaleilla ole. Koko, jossa nämä ominaisuudet poikkeavat, on riippuvainen materiaalista. Muun muassa pinta-atomien suuri määrä, suuri pintaenergia ja tilan rajoitukset aiheuttavat poikkeavuuksia nanopartikkelien ominaisuuksissa. Poikkeavia ominaisuuksia voivat olla esimerkiksi materiaalin sulamispisteen ja faasimuutoslämpötilan aleneminen, värin vaihtuminen koon mukaan (metallisilla nanopartikkeleilla), sähkönjohtavuus pienenee ja materiaalin magneettiset ominaisuudet muuttuvat. (6)

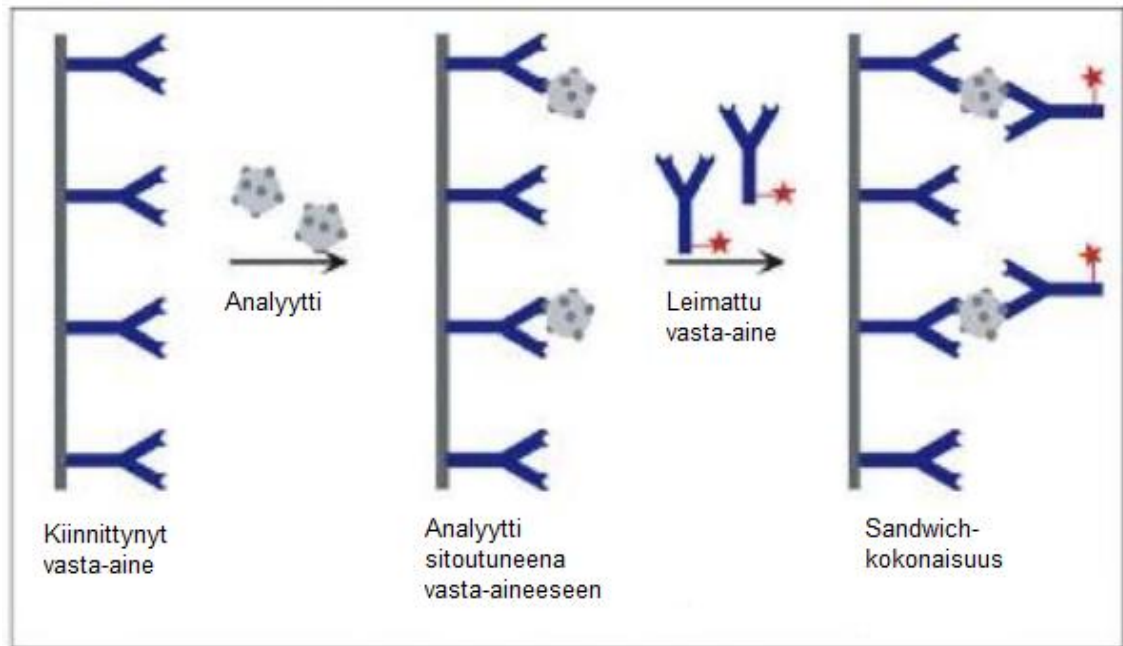
Suuri osa poikkeavista ominaisuuksista johtuu nanopartikkelien koosta ja näin ollen nanorakenteisten materiaalien ominaisuuksia voidaan säätää muuttamalla kokoa, muotoa tai agglomeraation määrää. Tästä on esimerkkinä erimuotoisten ja erikokoisten nanopartikkelien erilaiset absorbanssi- ja fluoresenssiominaisuudet. Metallisten nanopartikkelien absorptiomaksimi voi

siirtyä satoja nanometrejä riippuen partikkelin muodosta ja koosta. (6) Nanopartikkeleita käytetään monissa eri sovellutuksissa, esimerkiksi maaleissa, immunomäärityksissä tai lääkkeiden kuljettajina kehossa. (7; 8; 9)

2.2 Heterogeeninen, ei-kilpaileva immunomääritys

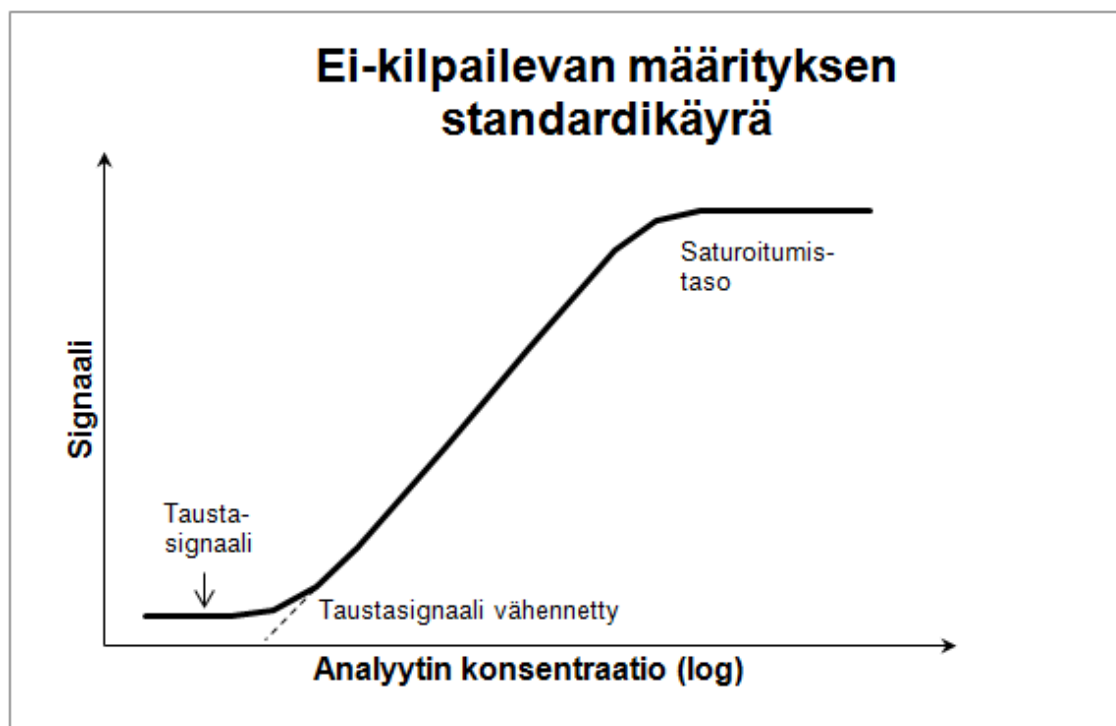
Heterogeeninen immunomääritys vaatii sitoutuneen ja sitoutumattoman aineen erotuksen toisistaan ennen mittaamista. Jos käytetään mikrotiitterilevyä, tämä yleensä tehdään erilaisilla pesuilla, riippuen käytetyistä materiaaleista. Pesuissa poistuu myös kaikki muu reagoimaton aine. (4; 10)

Kun kehitetään uusia menetelmiä, pyritään niistä kehittämään ei-kilpailevia, koska ne ovat menetelmänä herkempiä kuin kilpailevat määritykset. Ei-kilpailevassa määrityksessä käytetään ylimäärin vasta-ainetta, jolloin kaikki käytetty analyytti sitoutuu vasta-aineeseen. Näin ollen, kaikki vasta-aineiden sitoutumiskohdat eivät täyty. Jotta voidaan määrittää sitoutuneen analyytin määrä, pitää reaktioon lisätä toinen vasta-aine, joka on leimattu. Leimat voivat olla esimerkiksi fluoresoivia. Tämä leimattu vasta-aine sitoutuu analyytin toiseen sitoutumispaikkaan, epitooppiin, ja näin ollen muodostuu ns. sandwich. Tämän muodostumista havainnollistaa kuva 1. Jotta sandwich voisi muodostua, pitää analyytillä olla vähintään kaksi sitoutumispaikkaa. Kun kaikki sitoutumaton aine on pesty, voidaan tämän sandwich-kokonaisuuden signaali mitata. (4; 11)



Kuva 1. Ei-kilpailevan immunomäärityksen periaate. (4)

Kuvassa 2 on esitetty ei-kilpailevalle määrittelykselle tyypillinen standardikäyrä. Siitä nähdään, että signaali, joka saadaan, on suoraan verrannollinen analyytin määrään eli analyytin määrän kasvaessa myös signaali kasvaa. Jos tästä määrittelyksestä saatavista signaaleista vähennetään taustasignaali, saadaan dynaamisella mittausalueella lineaarinen suora, joka on piirretty kuvaan kaksi katkoviivalla. Saturoitumistasolla kaikki analyytin sitoutumispaikat ovat täynnä eli signaali ei enää nouse vaikka analyyttia lisättäisiinkin. Ei-kilpaileva määrittelysmenetelmä sopii parhaiten isoille analyyttimolekyyleille, joilla on todennäköisesti useampia sitoutumispaikkoja. (4; 11)



Kuva 2. Ei-kilpailevan immunomäärityksen standardikäyrä.

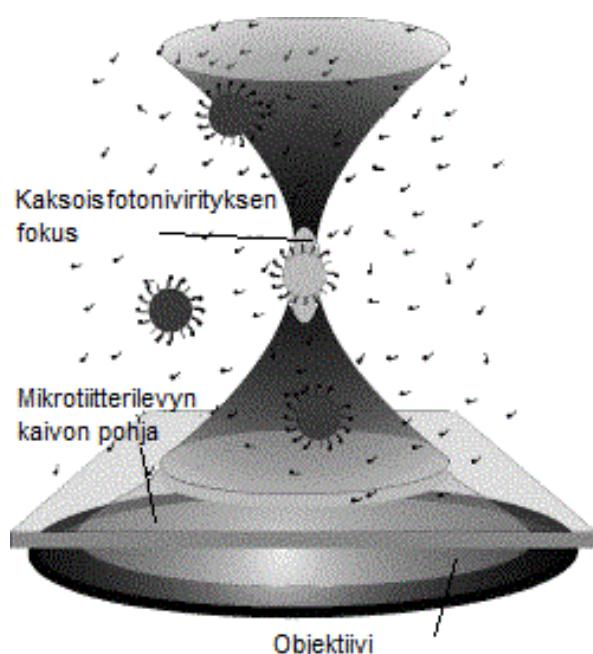
2.3 Kaksoisfotoniviriteinen fluoresenssi

Kaksoisfotoniviriteiseen fluoresenssiin perustuva tekniikka (TPX) on mikroanalyttinen bioaffiniteettimääritys, joka on kehitetty Turun yliopiston biolääketieteen laitoksen biofysiikan laboratoriossa. Siinä yhdenmuotoiset polymeerimikropallot, joiden halkaisija on 1-10 μm , toimivat bioaffiniteettireaktion kiinteänä faasina. Näyte, joka sisältää tutkittavan analyytin, inkuboidaan bioaktiivisten ja spesifisten mikropallojen sekä fluoresoivien molekyylien kanssa. Analyytti ja/tai fluoresoivalla leimalla merkitty molekyyli kiinnittyy mikropallojen pinnalle. (11; 12)

Kaksoisfotoniviritys tarkoittaa tapahtumaa, jossa kaksi fotonia virittää samanaikaisesti fluoresoivan molekyylin. Absorptio on mahdollinen, jos nämä kaksi fotonia osuvat noin 10^{-15} s:n aikana molekyylin vaikutusalueelle. Mikäli näin tapahtuu, fotonien energiat yhdistyvät ja seurauksena syntyy viritystila. (11)

TPX:ssa mitataan mikrofluorometrillä yksittäisestä mikropallosta tuleva fluoresenssisignaali (Kuva 3). Mikrofluorometri pystyy tarkalleen erottamaan

mikropartikkeleihin kiinnittyneiden ja kiinnittymättömien fluoresoivien molekyylien fluoresenssisignaalit toisistaan. Tämä on mahdollista, koska mittaus aktivoidaan ainoastaan, kun mikropallo on kaksoisfotonivirityksen fokuksessa. Laitteen optinen skannaus etsii mikropallot noin 10 nl:n mittaustilavuudesta, mutta kaikki mikropallot eivät päädy mittaukseen vaan ainoastaan murto-osa. TPX-teknologia mahdollistaa määritysten tekemisen ilman pesuja, joissa erotettaisiin sitoutuneet ja sitoutumattomat molekyylit toisistaan. Koska mittaukset voidaan tehdä mikrotilavuuksissa, reagenssien kustannukset alenevat. (11; 13)



Kuva 3. Yksittäisten mikropallojen mittaus kaksoisfotoniviritteisellä fluorometrillä. (13)

3 RINTASYÖPÄ

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpä ja Suomessa todetaan vuosittain yli 4000 uutta rintasyöpätapausta. Miehillä tämä syöpä on harvinainen, vuosittain todetaan vain noin parisenkymmentä uutta tapausta. Useimmiten rintasyöpään sairastunut henkilö on yli 45-vuotias, mutta sitä esiintyy myös nuoremmilla. Taudin ennuste on parantunut vuosien aikana, koska se pystytään diagnosoimaan aikaisessa vaiheessa ja hoitokeinot ovat kehittyneet entistä tehokkaammiksi. Nykyään yli 88 % rintasyöpäpotilaista on elossa viiden vuoden jälkeen taudin toteamisesta ja suurin osa heistä elää täysin normaalia elämää. (14; 15)

Rintasyöpä syntyy aivan kuten muutkin syövät. Solut alkavat jakautua hallitsemattomasti ja jakautuessaan useita kertoja ne muodostavat ison ryhmittymän, jota kutsutaan kasvaimeksi. Pahanlaatuisen rintasyöpäkasvaimen kehittyminen kestää yleensä monta vuotta ja se tapahtuu yleensä huomaamatta. Mikäli rintasyöpää ei havaita ajoissa, se saattaa levitä muualle kehoon, esimerkiksi luustoon tai keuhkoihin. Rintasyöpä jaetaan kahteen tyyppiin sen perusteella, mistä rinnan osasta syöpäsolut ovat saaneet alkunsa. Jos syöpä on saanut alkunsa rintatiehyistä, kutsutaan sitä duktaaliseksi, jos se puolestaan on saanut alkunsa rinnan rauhasrakenteista, sitä kutsutaan loburaaliseksi. Näistä kahdesti yleisempi on duktaalinen rintasyöpä, jota on 70 % kaikista rintasyövistä. (14)

3.1 Rintasyövän toteaminen

Tavallisin rintasyövän oire on kyhmy rinnassa, jonka tuntee tunnustelemalla. Lääkäri tekee myös silmämääräisen arvioinnin. Rintojen tunnustelua kutsutaan palpaatioksi, joka on tärkein tutkimus rintasyövän havainnoinnissa. Mikäli rinnasta löytyy kyhmy, jatketaan tutkimuksia mammografialla, ultraäänitutkimuksella ja/tai biopsialla. (16)

Mammografia on tärkein menetelmä rintasyövän diagnosoinnissa, arvioinnissa ja seurannassa. Sen avulla pystytään toteamaan rinnan sisäiset epänormaalit

muutokset. Normaalissa kuvauksessa kummastakin rinnasta otetaan kaksi kuvaa eri kulmista, vaikka pelkästään toisesta rinnasta olisi löytynyt kyhmy. Ultraäänitutkimuksella selvitetään rinnassa olevan kyhmyn luonnetta tarkemmin. Siinä rintojen läpi lähetetään korkeataajuisia ääniaaltoja, jotka muunnetaan kuviksi. (14)

Biopsioita on kahdentyypisiä, neulanäytteitä sekä kirurginen biopsia. Biopsia on menettelytapa, jossa kudoksesta otetaan näyte, joka lähetetään laboratorioon tutkittavaksi. Neulanäytteitä voidaan ottaa käyttäen kahta erilaista neulaa, joko ohuempaa tai paksumpaa. Ohutneulanäytettä otettaessa, lääkäri ottaa ohuella neulalla näytteen rinnassa olevasta kyhmystä. Solut vedetään neulalla ulos ja patologi tutkii ne mikroskoopin alla. Mikäli kyhmyssä ei ole nestettä tai kudoksesta on kovaa, ei nestettä saada ulos ollenkaan, jolloin on etsittävä toinen menetelmä. Paksuneulanäytteessä lääkäri käyttää paksua ja onttoa neulaa, jossa on erityinen kärki näytteenottoa varten. Neula työnnetään ihon läpi kudokseen ja kudoksesta otetaan näyte. Joskus voidaan käyttää imua, mikäli tahdotaan suurempi näyte. Tämä näyte lähetetään laboratorioon analysoitavaksi. Mikäli tulos ei ole selkeä, on näytteenotto tehtävä uudelleen tai näyte otettava jollakin toisella tavalla. (15; 17)

Kirurginen menetelmä vaatii ihon leikkausta ja näytteen ottaminen tapahtuu ihon alta. Joskus voidaan koko kyhmy poistaa ja tutkia. Mikäli kyhmyä ei tunnu, on ennen leikkausta tehtävä mammografia, jotta kyhmy voidaan paikantaa. Kudoksesta poistetaan kirurgisesti ja näyte lähetetään laboratorioon analysoitavaksi välittömästi. Tästä operaatiosta potilaalle yleensä jää arpi. (17)

3.2 Merkkiaineet

Syöpämerkkiaineet ovat molekyyliä, yleensä proteiineja, joita esiintyy joko veressä, virtsassa tai kudoksessa, jossa syöpä on, ja niiden tunnistaminen ja määrä ovat hyödyllisiä potilaan diagnosoinnissa ja kliinisessä hoidossa. Osa merkkiaineista syntyy syöpäsolujen aiheuttamana ja osa vasteena syöpäkasvaimelle. Merkkiaineita on monia erilaisia, joista osa esiintyy ainoastaan yhden tyyppisissä syövässä, mutta osa voi esiintyä monissa

erityyppisissä syövässä. Merkkiaineita ei kuitenkaan voida käyttää ainoana menetelmänä syövän diagnosoinnissa, koska merkkiaineiden pitoisuudet voivat olla koholla myös muissa sairauksissa eli kohonnut merkkiainepitoisuus ei aina viittaa syöpään. Tämän vuoksi syövän diagnosoinnissa on käytettävä lisäksi esimerkiksi muita laboratorio- ja kuvantamistestejä. Prostataspesifinen antigeeni (PSA) on tähän mennessä ainoa syöpämerkkiaine, joka on laajalti hyväksytty miesten eturauhassyövän seulontatutkimuksessa. (18; 19)

Rintasyöpää tutkittaessa yleisimmin käytetään mammografiaa ja koepaloja, mutta verikokeesta voidaan havaita eri aineiden pitoisuuksien olevan koholla. Tällainen aine on antigeeni CA15-3, joka on yksi rintasyövän yleisimpiä merkkiaineita. Rakenteeltaan se on suurimolekyylinen musiini. CA15-3-määrityksen keskeisin käyttö on rintasyövän seuranta. Kohonnut CA15-3-pitoisuus ei kuitenkaan aina viittaa rintasyöpään vaan sen pitoisuus voi kasvaa myös muiden syöpien, hyvälaatuisen rintakasvaimen tai maksasairauksien yhteydessä. (20; 21)

3.2.1 PSA

Prostataspesifinen antigeeni (PSA) on seriiniproteaasi, jota tuottaa lähinnä eturauhasen epiteelisolut, jonka vuoksi PSA:ta esiintyy korkeina konsentraatiopitoisuuksina siemennesteessä. Se on kooltaan 33 kD, joka koostuu 237 aminohapon glykoproteiiniketjusta, neljästä hiilihydraatti sivuketjusta ja useista disulfidisidoksista. PSA tunnetaan myös muun muassa nimillä kallikrein III sekä P-30 antigeeni. (22; 23)

PSA:n vapautuminen verenkiertoon on harvinaista nuorilla, terveillä miehillä, jolloin sen kohonnut pitoisuus saattaa viitata eturauhassyöpään. Tämän vuoksi PSA onkin eturauhassyövän tärkein merkkiaine, jonka kohonnut pitoisuus nähdään verikokeesta. Kohonnut PSA-arvo ei kuitenkaan aina viittaa eturauhassyöpään vaan se voi ilmentää myös eturauhasen hyvälaatuisia liikakasvua. PSA:n käyttöä syövän merkkiaineena voitaisiin tutkimusten mukaan laajentaa rintasyövän tutkimukseen, koska PSA:ta on löydetty naisten seerumista, joilla on rintasyöpä. Tutkimuksissa on todettu, että

rintasyöpäpotilailla, joilla oli korkeampi pitoisuus PSA:ta seerumissa, oli parempi ennuste kuin niillä, joilla oli matalampi PSA-pitoisuus. (1; 22; 24)

4 MENETELMÄT

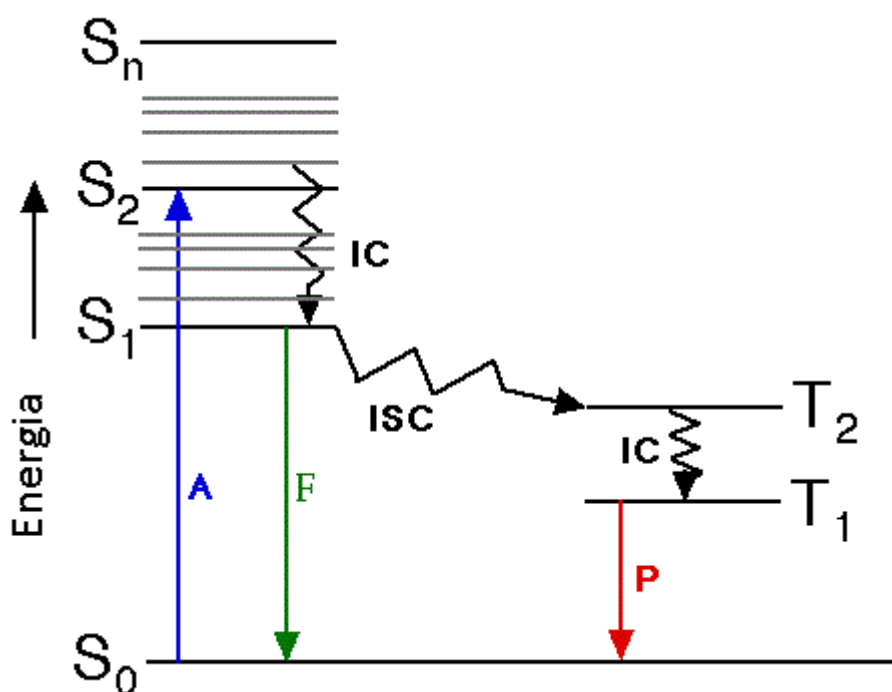
Diagnostiikka kuvaa menettelytapaa tai testiä, jolla saadaan tietää, mikä potilasta vaivaa tai mikä sairaus hänellä on. Diagnostiikka ei itsessään yritä parantaa sairauksia, vaan sitä käytetään informaation saamiseksi ja tutkimuksiin. 1990-luvun jälkeen diagnostiikka on elänyt suuressa murroksessa, se on kasvanut voimakkaasti, jonka seurauksena ala on automatisoitunut. Tämä puolestaan on luonut pohjan uudelle menetelmälle, lähitestaukselle eli pikadiagnostiikalle. Sen etuna vanhoihin menetelmiin verrattuna on sen nopeus ja edullisuus. Näille pikatesteille yleisinä edellytyksinä on spesifisyys, herkkyys ja helppous. Nykyään diagnostiikka on jo yleistä ja pikatestejä löytyy moniin eri tarkoituksiin. (25; 26)

4.1 Fluoresenssi

Fluoresenssi on yksi herkimmistä tunnistusmenetelmistä. Sen avulla voidaan tunnistaa yksi ainoa molekyyli. Luminesenssi eli loistevaloilmiö syntyy, kun aine emittoi valoa jonkin muun kuin lämpötilan aiheuttamana. Valon absorption seurauksena molekyyli siirtyy perustilaltaan virittyneelle tilalle. Tämä syntynyt viritystila voi purkautua monin eri tavoin ja yksi näistä on fluoresenssin aiheuttamana. Tällöin molekyyli emittoi fotonin palatessaan perustilaan. Fluoresoivia molekyyliä kutsutaan fluorofooreiksi, fluorokromeiksi tai fluoresoiviksi väreiksi. (11; 27; 28)

Kuvassa 4 on Jablonskin diagrammi, joka kuvaa molekyylin virittymiseen ja viritystilan purkautumiseen liittyvät siirtymät. Viritysenenergia voi purkautua monella tavalla, joko säteilevästi tai säteilemättömästi. Säteilevät siirtymät on esitetty suorilla viivoilla ja säteilemättömät siirtymät aaltoviivoilla. Kun molekyyli absorboi jostakin ulkoisesta lähteestä, esimerkiksi lampusta, tulevaa valoa, siirtyvät molekyylin elektronit perustilalta S_0 korkeammalle energiatasolle eli

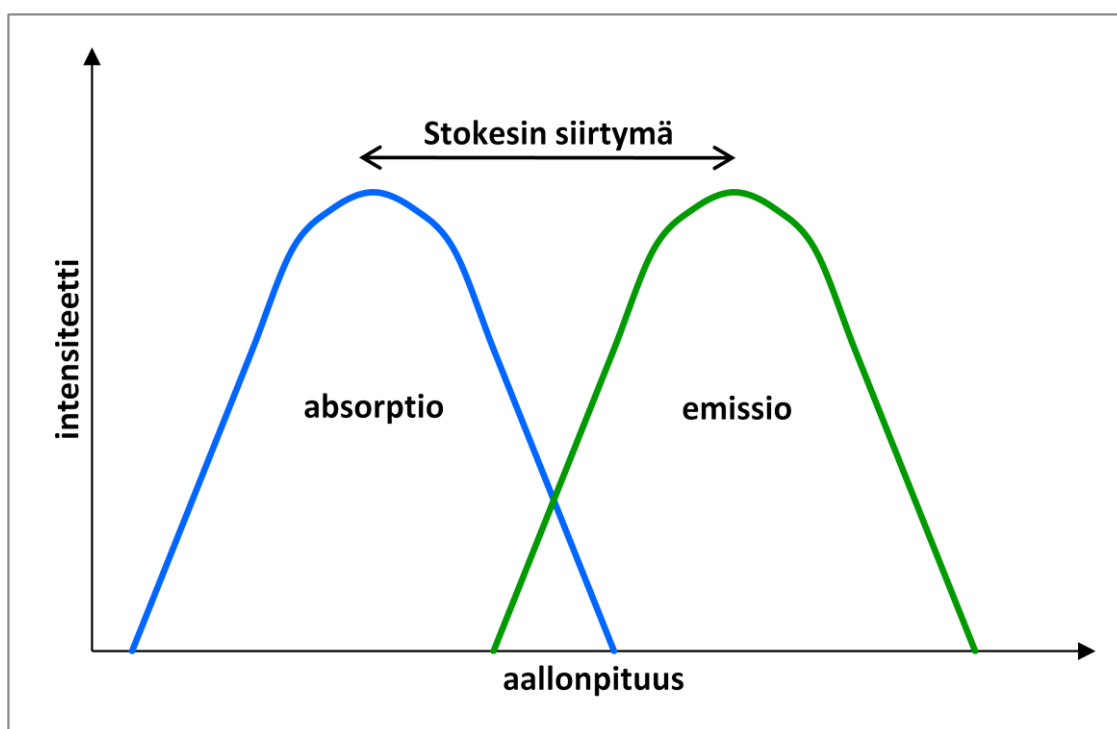
singlettitilalle S_1 - S_n . Kuvassa 4 absorptio on merkitty A-kirjaimella. Usein molekyyli virittyy ensimmäistä viritystilaa korkeampaan tilaan, jolloin tapahtuu hyvin nopea, säteilemätön, systeemin sisäinen siirtymä IC (internal conversion) S_1 -tilaan. Tällöin vapautuu siirtymisestä vastaava määrä energiaa ympäristöön. Molekyyli on virittyneenä S_1 -tilaan yleensä muutamien nanosekuntien ajan. Fluoresenssissa viritysentergia muuttuu valoksi (säteilevä prosessi), kun molekyyli palaa viritystilasta perustilaansa. Kuvassa 4 fluoresenssi on merkitty F-kirjaimella. Tämä mekanismi selittää, miksi fluoresenssispektri on usein riippumaton virittävän valon aallonpituudesta. (6; 11)



Kuva 4. Jablonskin energiatasodiagrammi. (29)

Toinen mahdollinen säteilemätön siirtymä on systeemin välinen siirtymä ISC (intersystem crossing), jolloin tapahtuu siirtyminen singlettitilasta triplettitilaan. Triplettitilan virittyneisyys relaxoituu T_1 -tilaan, jonka säteilevä deaktivoituminen on nimeltään fosforenssi P. Myös fosforenssi on riippumaton virittävän valon aallonpituudesta, mutta se on pidempiaikaisempi kuin fluoresenssi. (11)

Stokesin siirtymä kuvaa absorptiomaksimin ja emissiomaksimin välistä eroa. Tämä ero syntyy, koska viritystilän purkautumisessa vapautuvan valokvantin energia on pienempi kuin viritystilän aiheuttaneen valokvantin ja näin ollen emissioaallonpituus on pidempi kuin absorptioaallonpituus. Pitkä Stokesin siirtymä on tärkeä fluoresenssitekniikoiden herkkyydelle, koska sen avulla emissiofotonit voidaan havaita matalaa taustaa vasten ja siten erottaa ne viritysfotoneista. (6; 11)



Kuva 5. Stokesin siirtymä.

4.1.1 Fluoresenssileimat

Leima on yhdiste, mikro-organismi, kemiallinen ryhmä, partikkeli tai muu komponentti, joka voidaan helposti kiinnittää tutkittavaan systeemiin ja havaita tarkoitukseen sopivalla herkkyydellä. Näin ollen, fluoresoivia aineita eli fluoroforeja voidaan käyttää leimoina diagnostisissa määrittelyksissä. Fluoresenssileimat ovat radioaktiivisia leimoja turvallisempia, mutta eivät yhtä tehokkaita. Fluoresenssileimoilla on aina tietty elinikä, intensiteetti ja kvanttisaanto. Kvanttisaanto kuvaa emittoituvien ja absorboituvien fotonien

suhdetta. Kvanttisaannon suuruus riippuu käytettävästä leimamolekyylistä, aallonpituudesta ja mittaustilasta. Tämä arvo kuvaa leiman herkkyyttä eli sitä, miten suuri osa viritysen energiasta purkautuu valona. Leiman kirkkaus saadaan määriteltä, kun kerrotaan kvanttisaannon arvo absorptiovakiolla. Ja mitä kirkkaampi tai intensiivisempi fluoresenssi, sitä tehokkaampi leima on. (11; 29)

Virittymisen jälkeen molekyylit pysyvät virittyneessä tilassa lyhyen aikaa, ennen kuin palaavat perustilaansa. Tätä kutsutaan fluoresenssin eliniksi. Yleensä fluoresenssin elinikä vaihtelee pikosekunneista nanosekunteihin. Fluoresenssin elinikä voidaan määrittellä siirtymiin liittyvien nopeusvakioiden avulla tai mittaamalla pulssitetun valonlähteen avulla fluoresenssin intensiteettiä. Tämän intensiteetin avulla saadaan lasketuksi fluoresenssin elinikä, kun tiedetään leiman emissionopeusvakio ϵ . Elinikä on aika, jossa intensiteetti laskee alkuperäisestä arvosta $1/\epsilon$ osaan. (29)

Fluoresenssileimojen käytössä on kuitenkin ongelmia. Kun mitataan biologisten aineiden fluoresenssia, on ongelmana yleensä niin kutsuttu määrittystausta. Ongelmia on myös leiman spesifisessä sitoutumisessa. Vaikkakin tarkasti määritellyissä erityisolosuhteissa on päästy herkkyyteen, jolla voidaan havaita yksi ainoa molekyyli, on määrittystaustan korkeus yleensä esteenä tarpeeksi herkkien fluorometristen määritysten käyttöön rutiinimittauksissa. Aikaerotteinen fluorometria on tekniikka, jonka avulla haluttu signaali voidaan erottaa taustasignaalista. Sen toiminta perustuu siihen, että mitataan signaali vasta tietyn viiveajan jälkeen, jolloin taustan signaali on laskenut. Tämän vuoksi aikaerotteisessa fluorometriassa käytetään lantanidikelaatteja leimoina, koska ne ovat pitkäikäisiä. (28)

4.2 Bioaffiniteetti

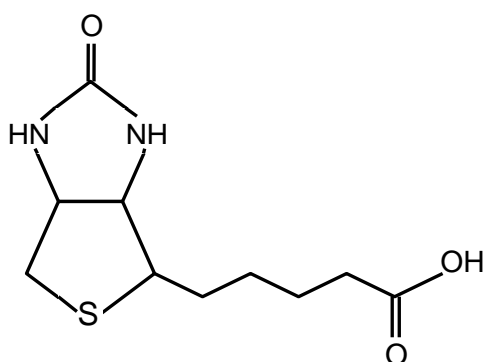
Affiniteetilla tarkoitetaan sitoutumista ja sitä käytetään hyväksi muun muassa affiniteettikromatografiassa. Luonnossa biologiset makromolekyylit, kuten proteiinit ja nukleiinihapot, sitoutuvat toisiin proteiineihin, nukleiinihappoihin tai muihin pieniin molekyyleihin hyvin spesifisesti. Tämä spesifisyys johtuu siitä,

että interaktio vaatii yleensä useiden eri kiinnittymismekanismien samanaikaista toimintaa. Esimerkiksi vetysidokset ja hydrofobiset vuorovaikutukset ovat tällaisia kiinnitysmekanismeja. Affiniteettia voidaan hyödyntää esimerkiksi proteiinien puhdistukseen sekä diagnostiikkaan. Kun affiniteettia käytetään diagnostisissa menetelmissä, käytetään siitä nimitystä bioaffiniteetti. Tämä menetelmä on yksi yleisimmin käytetyistä menetelmistä diagnostiikassa. Yksi luonnostaan voimakkaimpia tunnetuista sidoksista on biotiinin ja streptavidinin välinen sidos. Tätä lujaa sidosta voidaan soveltaa monella eri aloilla, kuten esimerkiksi proteiini- ja nanoteknologiassa. (30; 31; 32)

5 MATERIAALIT

5.1 Biotiini

Biotiini on rikkiä sisältävä, optisesti aktiivinen, pieni, orgaaninen happo, jota on jokaisessa elävässä solussa. Se tunnetaan myös nimillä H- ja B₇-vitamiini. Biotiinin aktiivinen muoto on D-isomeeri ja sen molekyylipaino on noin 244 Da. Sen kemiallinen rakenne on C₁₀H₁₆N₂O₃S, joka muodostuu kahdesta hiilirenkaasta sekä neljän hiilen pituisesta ketjusta. Tämä rakenne on esitetty kuvassa 6. (33)



Kuva 6. Biotiinin kemiallinen rakenne.

Biotiini toimii katalyyttina monissa entsyymaattisissa karboksylaatio reaktioissa. Se sitoutuu erittäin kovin muun muassa streptavidiiniin, jonka vuoksi biotiinia käytetään esimerkiksi bioaffiniteettimäärityksissä. (30; 33)

5.2 Streptavidiini

Streptavidiini on tetrameerinen proteiini, jota on *Streptomyces avidiini* – bakteerissa. Streptavidiini on kooltaan 55 kD ja siinä on neljä sitoutumiskohtaa. Se on yleisesti käytössä immunomäärityksissä, biotinyloitujen proteiinien ja muiden biotinyloitujen antigeenin havaitsemisessa. Streptavidiini on käytännöllinen, koska se sitoo biotiinia lujasti. Biotiinin käyttö määrityksissä vaikuttaa vain vähän tai ei ollenkaan vasta-aineen sitoutumiskykyyn, joten on perusteltua käyttää määrityksissä biotiini-streptavidiini-yhdistelmää. (34)

5.3 Europium

Europium on alkuaine, joka kuuluu lantanidien ryhmään. Se esiintyy kolmen arvoisena ionina (Eu^{3+}). Lantanidikelaatteja käytetään yleisesti aikaerotteisissa fluoresenssi-mittauksissa. Europium-kelaatin fluoresenssin ominaisia piirteitä ovat pitkä Stokesin siirtymä (n. 270 nm), ligandien kohtuullinen absorbanssi, laaja viritysalue, kapea emissiomaksimi (n. 613 nm) ja pitkä elinikä. Jotta fluoresenssileima olisi käytännöllinen aikaerotteisessa fluorometriassa, sen eliniän pitäisi olla vähintään 10 μs ja mielellään yli 50 μs . Lantanidikelaattien elinikä on millisekunnin luokkaa. Nesteeseen liuenneena europiumin fluoresenssi on vähäistä, mutta kelatoituneena ligandiin se alkaa fluoresoida voimakkaasti. Vesiliuos sammuttaa europiumin fluoresenssia, koska osa viritetyn kompleksin energiasta siirtyy lämpönä ympäröiviin vesimolekyyliin, eikä energia siirrykään ligandiin. Europium on lantanideista käytetyin. (6; 28)

Europiumkelaattien fluoresenssi syntyy seuraavien viritys ja emissiovaiheiden kautta:

- 1) orgaaninen ligandi virittyy
- 2) viritysentergia siirtyy ligandissa singletttilasta triplettilaan

- 3) intramolekulaarisen energiasiirtymän välityksellä energia kulkee ligandin triplettitasolta europiumin resonanssitasolle
- 4) europiumioni vapauttaa energian valoemissiona. (6)

5.4 BF530-leima

BF-leimat kuuluvat dipyrrometiinibooridifluoridivärien (dipyrrometiini-BF₂-värien) ryhmään. Ne esiteltiin jo 1960-luvulla ja siitä asti niitä on ollut kaupallisesti tarjolla ja niitä on käytetty useisiin eri käyttösovellutuksiin, esimerkiksi immunomäärityksiin ja fluoresenssimikroskopointiin. Dipyrrometiini-BF₂-väreillä on monia fluoresenssileimalta toivottavia ominaisuuksia; korkea kvanttisaanto, terävät absorptio- ja emissiospektrit, sekä suhteellisen korkea absorptiokerroin. Koska dipyrrometiini-BF₂-värit ovat hydrofobisia, rajoittuu niiden käyttö ainoastaan biomolekyylien leimaamiseen. (11)

BF-leimat ovat dipyrrometiini-BF₂-fluorokromiin perustuvia leimausreagensseja, jotka kehitettiin Turun yliopiston biofysiikan laboratoriossa. Ne kehitettiin fluoresoiviksi komponenteiksi TPX-mittauksiin. Nämä leimat sisältävät kaksi karboksyyli ryhmää, joista toisen tarkoituksena on mahdollistaa biomolekyylin leimaaminen käyttämällä aminoryhmää. Toinen aminoryhmä on vapaana ja parantaa liukoisuutta vesipitoisissa liuksissa. BF-leimoja on kehitetty monia erilaisia, joiden absorptio- ja emissiomaksimit ovat eri aallonpitoisuuksilla. Kaikkien BF-leimojen kvanttisaanto on suurempi kuin 0,5 eli yli puolet viritysenergiasta purkautuu valona. Eliniältään BF-leimat ovat 2-5 ns. (11)

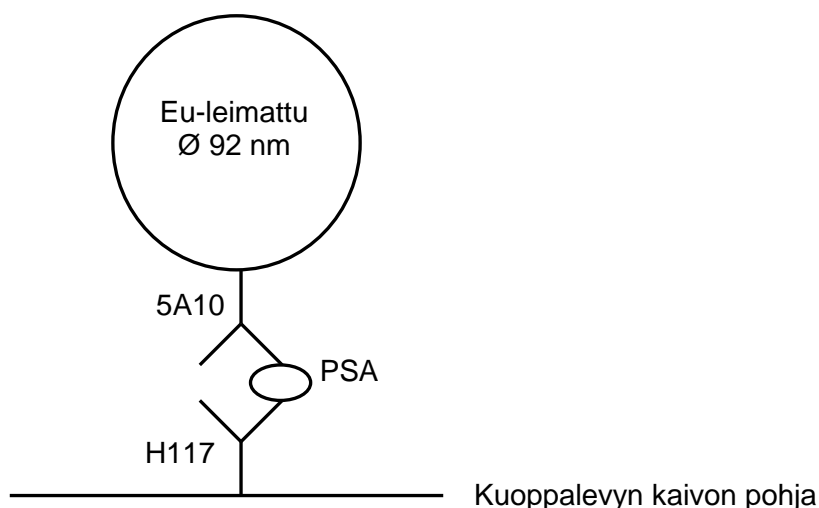
Tässä työssä on käytetty BF530-leimaa. Sen absorptiomaksimi on noin 530 nm: alueella ja emissiomaksimi on 552 nm:n aallonpituudella, joten Stokesin siirtymä on 22 nm. (11)

6 MÄÄRITYKSET

Tutkittiin kahden eri menetelmän kykyä havainnoida PSA-pitoisuuksia. Nämä kaksi menetelmää olivat heterogeeninen, ei-kilpaileva immunomääritys sekä kaksoisfotoniviritykseen perustuva mittausmenetelmä (TPX).

6.1 Heterogeeninen, ei kilpaileva immunomääritys

Heterogeenisessä mittauksessa analyyttina käytettiin PSA:ta ja fluoresoivana komponenttina europium-kelaateilla leimattuja polystyreeninanopalloja: Seradyn, USA, Ø 92 nm. Palloihin on kiinnitetty toinen vasta-aine 5A10. Määrityksen perustana on, että biotinyloitu vasta-aine H117 sitoutuu streptavidinikoutatun kuoppalevyn pohjaan. Siihen sitoutuu analyyttina toimiva PSA ja tähän puolestaan sitoutuu vasta-aine 5A10 ja näin ollen myös Eu-leimattu nanopallo. (Kuva 7) Sitoutumattomat nanopallot pestään levypesurilla pois, joten signaalia saadaan ainoastaan sitoutuneista palloista. Inkuboinnit tapahtuivat aina huoneenlämmössä ja levysekoittimessa, jonka sekoitusnopeus oli matala.



Kuva 7. Heterogeenisen määrityksen periaate.

Menetelmän kehittäminen aloitettiin seuraavalla protokollalla, jossa kuoppalevylle pipetoitiin biotinoloitu vasta-aine H117, PSA ja 5A10-päällystetty, Eu-leimattu nanopallo ja puskurina käytettiin Delfia® Assay Bufferia:

vasta-aine H117 (2,96 mg/ml, ei biotinyloitu) kiinnitettynä suoraan mikrotiitterilevyn pohjaan

40 µl PSA (5 µg/ml)

15 min inkubointi levysekoittimessa, jonka jälkeen levy pestiin 2 kertaa

40 µl Eu-leimattuja nanopalloja ($5,5 \cdot 10^9$ kpl/ml)

1 h inkubointi levysekoittimessa, jonka jälkeen levy pestiin 6 kertaa

Mittaus suoritettiin välittömästi levyn pesun jälkeen. Vasta-aineen määrä kuoppalevyn kaivon pohjassa oli noin 100 ng, PSA:n pitoisuudet olivat 0; 0,1; 1 ja 10 ng/ml, joista kustakin pipetoitiin kolme rinnakkaista ja Eu-leimattuja nanopalloja oli $5 \cdot 10^8$ kpl/kuoppa. Koska PSA:n pitoisuus vaihteli, nähtiin kyseisistä pitoisuuksista alhaisin, joka erottui taustasta. Tämä PSA-pitoisuus oli 0,1 ng/ml, jota käytettiin suurimmaksi osaksi tulevissa testeissä. (LIITE 1)

6.1.1 Komponenttien optimointi

Eri komponenttien optimoinnilla pyrittiin alentamaan taustasignaalia ja näin ollen parantamaan menetelmän kykyä erottaa matalia pitoisuuksia PSA:ta reaktioseoksessa. Määrittystä kehitettäessä optimoitiin biotinyloidun vasta-aineen H117 määrä, 5A10-päällystettyjen, Eu-leimattujen nanopallojen määrä sekä käytettävä puskur.

Tutkittiin paljonko Eu-leimattuja, 5A10-päällystettyjä nanopalloja tulisi yhdessä kuopassa käyttää. Tämä testattiin vaihtelemalla nanopallojen määrää ja pitämällä muiden komponenttien määrät vakiona. Vasta-aine H117 oli kiinnitetty suoraan 96-kuoppalevyn pohjaan ja PSA-pitoisuuksina käytettiin 0 ja 0,1 ng/ml (40 µl/kuoppa). PSA:n lisäyksen jälkeen levyä inkuboitiin 15 min, jonka jälkeen kuopat pestiin levypesurilla kahteen kertaan. Testattavat pallomäärät olivat $1 \cdot 10^7$, $3 \cdot 10^7$, $1 \cdot 10^8$ sekä $3 \cdot 10^8$ ja yhteen kuoppaan pipetoitiin 40 µl palloliuosta.

Levyä inkuboitii tunnin ajan, jonka jälkeen se pestiin kuusi kertaa. Puskurina käytettiin Delfia[®] Assay Bufferia. Valittiin käytettäväksi $3 \cdot 10^7$ Eu-palloa, koska tällöin PSA:n signaali on tarpeeksi korkea, eikä tausta kuitenkaan ole vielä häiritsevän suuri. (LIITE 2)

Testattiin, onko parempi kiinnittää vasta-aine H117 suoraan keltaisen 96-kuoppalevyn pohjaan vai kiinnittää biotinoloitu vasta-aine H117 streptavidiniin välityksellä kiinni kaivon pohjaan. Todettiin, että käytettäessä 96-kuoppalevyjä, joiden kaivot on päällystetty streptavidiinillä, saadaan aikaan paremmat tulokset kuin, jos vasta-aine H117 on liitetty suoraan kaivon pohjaan. Lopuissa testeissä käytettiin siis streptavidinilla päällystettyjä 96-kuoppalevyjä.

Tutkittiin tulisiko käyttää monoklonaalista vasta-ainetta (mAb) H117 vai sen Fab-osaa ja paljonko vasta-aineita tulisi käyttää. Todettiin, että Fab-osan käytöllä saadaan aikaan parempi suhde signaalien välille. Suuressa osassa testeistä käytettiin kuitenkin monoklonaalista vasta-ainetta H117, koska Fab-osa loppui. Testattiin vasta-aineen optimaalista määrää vaihtelemalla sen pitoisuuksia ja pitämällä muiden komponenttien määrät vakiona: PSA:ta oli 0 tai 0,1 ng/ml (40 µl/kuoppa) ja Eu-leimattujen pallojen määrä oli $3 \cdot 10^7$ kpl/kuoppa ja palloliuosta pipetoitiin 40 µl yhteen kuoppaan. Pipetoitiin rinnakkaisia näytteitä kolme keltaisen 96-kuoppalevyn kuoppiin. Testattavina pitoisuuksina käytettiin 10, 30, 100 ja 300 ng/kuoppa ja puskurina käytettiin Delfia[®] Assay Bufferia. Ennen vasta-aineen H117 pipetointia kuoppalevyn streptavidinilla päällystettyihin kuoppiin, levy pestiin kaksi kertaa. Vasta-aineen H117:n lisäyksen jälkeen levyä inkuboitii 30 min, jonka jälkeen se pestiin kaksi kertaa. PSA:n pipetoinnin jälkeen levyä inkuboitii 15 min, jonka jälkeen se pestiin jälleen kahteen kertaan. Eu-leimattujen nanopallojen lisäyksen jälkeen levyä inkuboitii tunnin ajan, jonka jälkeen levy pestiin kuusi kertaa. Parhaimman taustan ja PSA:n signaalin suhde oli, kun käytettiin 30 ng vasta-ainetta/kuoppa. (LIITE 3)

Testattiin myös eri puskureiden antamia signaaleja, koska niissä voi olla isojakin eroja. Puskureita testattiin kolme erilaista: Delfia[®] Assay Buffer (pH 7,8), ArcDian puskuri (pH 8,0) sekä Innotracs Solution Buffer (punainen). Ennen

vasta-aineen H117 lisäystä streptavidinilla päällystetty kuoppalevy pestiin kaksi kertaa. Testissä käytettiin vasta-aineen H117 Fab-osaa (30ng/kuoppa), jota inkuboitii 30 min, jonka jälkeen kuoppalevyn kaivot pestiin levypesurilla kaksi kertaa. PSA:n pitoisuus oli 10 ng/ml ja sen lisäyksen jälkeen levyä inkuboitii 15 min, jonka jälkeen levy pestiin kaksi kertaa. Eu-leimattujen nanopallojen määrä oli $6 \cdot 10^7$ kpl/kuoppa ja inkubointiaikana käytettiin yhtä tuntia, jonka jälkeen levy pestiin kuusi kertaa. Tuloksena saatiin, että Innotracin puskuri antaa parhaimman suhteen taustan ja PSA:n signaalin välille, joten sitä käytettiin tulevilla testauksissa. (LIITE 4)

6.1.2 Komponenttien vaikutus menetelmän herkkyyteen

Tutkittiin kahden eri kasvatusmediumin vaikutusta menetelmän herkkyyteen. Mediumeina käytettiin puhdasta DMEM + 10 % iFBS + penisilliini/streptomysiini + L-glutamiini sekä RPMI-1640, jossa oli L-glutamiinia + 15 % iFBS + penisilliini/streptomysiini + 1 mM natriumpuryvaattia + 10 mM Hepesta. Mediumipitoisuuksina käytettiin 0, 10, 25, 50 ja 100 % ja PSA:n pitoisuudet olivat 0 ja 0,1 ng/ml. Ennen testin aloittamista, streptavidinilla päällystetty kuoppalevy pestiin kaksi kertaa. Monoklonaalisen vasta-aineen H117 määrä oli 30 ng/kuoppa ja yhteen kuoppaan pipetoitiin 40 µl liuosta, jonka jälkeen levyä inkuboitii 30 min ja tämän jälkeen levy pestiin kaksi kertaa. PSA:n ja mediumin lisäyksen jälkeen levyä inkuboitii 20 min, jonka jälkeen levy pestiin kahteen kertaan. Eu-leimattuja nanopalloja pipetoitiin 40 µl/kuoppa, siten että jokaisessa kuopassa oli $3 \cdot 10^8$ kpl palloja, jonka jälkeen levyä inkuboitii yksi tunti ja tämän jälkeen levy pestiin kuusi kertaa. Saatujen tulosten perusteella todettiin, että 20 %:n mediumpitoisuus on vielä siedettävä. (LIITE 5)

Selvitettiin myös, miten solumäärä vaikuttaa menetelmän herkkyyteen. Tutkittiin LnCap-solulinjaa, jota käytetään yleisesti onkologiassa. LnCap-solulinja tuottaa PSA:ta, jonka vuoksi se soveltui tähän tutkimukseen. Vertailuun käytettiin solulinjaa A549, joka ei tuota PSA:ta. Biotinyloidun vasta-aineen H117 määrä oli 30 ng/kuoppa ja PSA:n pitoisuus oli joko 0 tai 0,1 ng/ml. Solumäärinä käytettiin $89,5 \cdot 10^2$, $89,5 \cdot 10^3$, $89,5 \cdot 10^4$, $89,5 \cdot 10^5$ sekä $89,5 \cdot 10^6$. Eu-leimattuja nanopalloja

käytettiin $3 \cdot 10^8$ kpl/kuoppa. Ennen vasta-aineen H117 lisäystä streptavidinilla päällystetty kuoppalevy pestiin kaksi kertaa. Vasta-aineen H117 lisäyksen jälkeen levyä inkuboitiin 30 min, jonka jälkeen se pestiin kaksi kertaa. PSA:n ja solujen lisäyksen jälkeen levyä inkuboitiin 30 min. Tämä jälkeen levy pestiin kaksi kertaa. Eu-leimattujen nanopallojen lisäyksen jälkeen levyä inkuboitiin yksi tunti, jonka jälkeen levy pestiin kuusi kertaa. (LIITE 6)

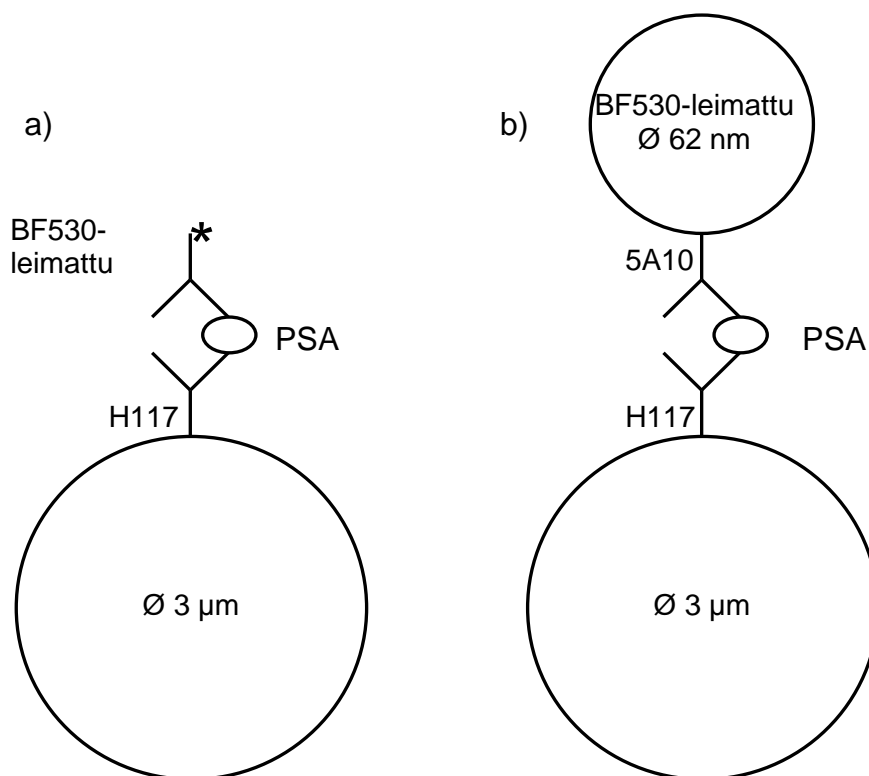
Tutkittiin erittäkö LnCap-solulinja PSA:ta kasvatusmediumiin, koska tällöin testit voitaisiin tehdä ilman solujen hajotusta, jolloin säästyisi aikaa. LnCap-solut kasvoivat RPMI-1640-mediumissa, jossa oli mukana L-glutamiinia + 15 % iFBS + penisilliini/streptomysiini + 1 mM natriumpuryvaattia + 10 mM Hepesta. Kontrollina käytettiin A549-soluja, jotka kasvoivat RPMI-1640, jossa oli L-glutamiinia + 10 % iFBS + penisilliini/streptomysiini. Testi tehtiin sekä 20 %:n että 50 % mediumpitoisuuksilla. Biotinyloitua vasta-ainetta H117 käytettiin 30 ng/kuoppa. Yhteen 96-kuoppalevyn kuoppaan vasta-aineliuosta pipetoitiin 40 µl, jonka jälkeen levyä inkuboitiin 30 min, jonka jälkeen levy pestiin kaksi kertaa. PSA:n pitoisuudet mediumistandardeissa oli 0; 0,01; 0,1, 1 ja 10 ng/ml ja yhteen kuoppaan pipetoitiin 40 µl mediumin ja PSA:n liuosta. Jokaisesta pitoisuudesta pipetoitiin kaksi rinnakkaista näytettä. Näytemedumeihin ei lisätty PSA:ta, koska tarkoituksena oli saada tietää, erittykö kasvatusmediumiin PSA:ta soluista. Lisäyksen jälkeen levyä inkuboitiin 30 min, jonka jälkeen se pestiin kahteen kertaan. Eu-leimattuja nanopalloja käytettiin $3 \cdot 10^8$ kpl/kuoppa ja palloliuosta pipetoitiin kuoppiin 40 µl. Tämä jälkeen levyä inkuboitiin tunnin ajan, jonka jälkeen se pestiin kuusi kertaa. Puhtaasta mediumista ja PSA:sta saatiin standardit, joiden perusteella nähtiin erittykö PSA:ta tutkittavista soluista ulos (näytteisiin ei lisätty PSA:ta) ja mikäli näin oli, niin kuinka paljon. (LIITE 7)

Tehtiin sama testi uudelleen, koska osa näytteiden fluoresensseista meni yli mitta-asteikon, joten niitä piti laimentaa. Käytettiin kuitenkin ainoastaan 20 %:n mediumipitoisuutta. Vasta-aineen H117 pitoisuus oli edelleen 30 ng/ml ja PSA:n pitoisuudet pysyivät myös samoina. Eu-leimattujen nanopallojen määrä oli tällä kertaa $3 \cdot 10^7$ kpl/kuoppa. LnCap-solunäytteestä tehtiin kaksi laimennosta, jotka olivat 1/10 ja 1/100 alkuperäisestä kasvatusmediumista. Tästä saatiin

määritettyä paljonko LnCap-solulinja tuottaa PSA:ta mediumiinsa sekä menetelmän herkkyys, eli pienin pitoisuus, minkä se tunnistaa PSA:ta seoksessa. (LIITE 8)

6.2 TPX-menetelmä

TPX-menetelmässä käytettiin analyyttina PSA:ta ja fluoresoivana komponenttina oli BF530-väriaine. Menetelmän periaatteena oli, että halkaisijaltaan 3 µm:n mikropalloihin (Seradyn, USA, Ø 3,098 µm) sitoutui biotinyloitu vasta-aine H117. Tähän puolestaan sitoutui analyytti PSA, jonka toiseen sitoutumiskohtaan liittyi sekundaarinen vasta-aine 5A10, joka oli leimattu BF530-värillä. Tutkittiin menetelmän herkkyyttä, kun vasta-aine 5A10 oli suoraan värjätty BF530:lla, sekä kun vasta-aine 5A10 oli päällystetty 62 nm:n halkaisijaltaan oleviin nanopalloihin (Biofysiikan laboratorio, Ø 62 nm), jotka oli värjätty BF530:lla. (Kuva 8) Menetelmä perustuu ei-kilpailevaan määrittelyyn, mutta se ei ole heterogeeninen, koska menetelmä ei sisällä pesuja ja näin ollen se on nopeampi määrittely pystyttää. Mittauksissa menee kuitenkin enemmän aikaa kuin heterogeenisessä, ei-kilpailevassa immunomäärittelyssä. Menetelmässä käytettiin mustaa 384-kuoppalevyä, jossa oli läpinäkyvä muovipohja.



Kuva 8. a) TPX-menetelmän periaate, jossa käytettiin BF530-leimattua vastaainetta 5A10. b) TPX-menetelmän periaate, jossa käytettiin BF530-leimattua mikropalloa.

TPX-laite ohjelmoitiin mittaamaan yhtä kaivoa aina 45 s:n ajan ja viiden minuutin välein levyä sekoitettiin täristämällä, jotta mikropallot eivät mittauksen aikana laskeutuisi kuoppalevyn kaivojen pohjille. Levyjen päällä käytettiin teippiä, jotta näytteistä ei pääsisi haihtumaan nesteitä, eivätkä näytteet roiskuisi ravistelun aikana.

6.2.1 Komponenttien optimointi

Menetelmän kehittäminen aloitettiin optimoimalla biotinyloidun vasta-aineen H117 määrä. Testauksessa yhdessä 384-kuoppalevyn kuopassa käytettiin $5 \cdot 10^4$ kpl streptavidinilla koutattuja $3 \mu\text{m}$:n mikropalloja. Pallot laimennettiin ArcDian puskuriin ja liuosta pipetoitiin $5 \mu\text{l}$ yhteen kuoppaan. Biotinyloidun vasta-aineen H117 määrä vaihteli, koska haluttiin määrittää, mikä olisi sen optimimäärä reaktioseoksessa. Tutkitut määrät olivat 1, 3, 10 ja 30 ng/kuoppa . H117 laimennettiin myös ArcDian puskuriin ja liuosta pipetoitiin $5 \mu\text{l}$ jokaiseen

kuoppaan. PSA-pitoisuuksina käytettiin 0 ja 1 ng/ml, ja yhteen kuoppaan pipetoitiin 5 µl liuosta. BF530-leimatun vasta-aineen 5A10 määrä tässä määrittelyssä oli 30 ng/kuoppa ja liuosta pipetoitiin 5 µl yhteen kuoppaan. Signaali mitattiin heti, kun kaikki komponentit oli pipetoitu kaivoihin. (LIITE 9)

Toisena optimoitiin BF530-leimatun vasta-aineen 5A10 määrä. Yhdessä kuopassa käytettiin $5 \cdot 10^4$ kpl 3 µm:n mikropalloja, joita pipetoitiin 5 µl yhteen kuoppaan. Vasta-aineen H117 määrä yhdessä kuopassa oli 3 ng ja pipetoitiin 5 µl liuosta 384-kuoppalevyn kuoppiin. PSA:n määrä kuopassa oli joko 0 tai 1 ng/ml ja sitä pipetoitiin 5 µl yhteen kuoppaan. Vasta-aineen 5A10 määrä vaihteli. Käytetyt pitoisuudet olivat 1,3,10 ja 100 ng/kuoppa ja yhteen kuoppaan pipetoitiin 5 µl liuosta. Tuloksista nähtiin, että seuraavissa testeissä kannattaisi käyttää 3 ng/kuoppa vasta-ainetta H117 ja 3 ng/kuoppa vasta-ainetta 5A10. (LIITE 9) Tuloksista nähtiin, ettei sitoutumista ollut tapahtunut, joten tutkittiin, mikä komponentti ei toiminut. Tulosten perusteella streptavidinilla päällystetyt mikropallot eivät toimineet halutulla tavalla. Tästä johtuen päällystettiin 3 µm:n mikropallot H117 streptavidinin sijaan. Pallojen toimivuus testattiin pipetoimalla 384-kuoppalevyn kuoppiin $5 \cdot 10^4$ kpl mikropalloja (10 µl/kuoppa). PSA-pitoisuudet olivat 0; 0,1; 1, 10 ja 100 ng/ml ja pipetoitiin jokaista liuosta 5 µl kahteen rinnakkaiseen kuoppaan. Jokaiseen kuoppaan laitettiin 3 ng BF530-leimattua vasta-ainetta 5A10. Tätä pipetoitiin 5 µl yhteen kuoppaan. Tuloksista nähtiin, että nyt mikropallot toimivat. (LIITE 10)

Optimoitiin BF530-leimattujen nanopallojen, joihin oli kiinnitetty vasta-aine 5A10, määrä sekä käytettävä puskuri. Testattiin kahta eri puskuria, jotka olivat ArcDian puskuri ja Innotrac Solution Buffer. Vasta-aineella H117 päällystettyjä mikropalloja haluttiin jokaiseen kuoppaan $5 \cdot 10^4$ kpl. Jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 10 µl palloliuosta. PSA:n pitoisuus kuopassa oli joko 0 tai 10 ng/ml (5 µl/kuoppa). BF530-leimattujen, vasta-aineella 5A10 päällystettyjen nanopallojen määrä kuopissa vaihteli. Määrät olivat $3 \cdot 10^7$, $1 \cdot 10^8$, $3 \cdot 10^8$ sekä $1 \cdot 10^9$. Palloliuoksia pipetoitiin 5 µl kolmeen rinnakkaiseen kuoppaan. Tuloksista nähtiin, että ArcDian puskuri toimii määrittelyssä paremmin. (LIITE 11)

Tutkittiin TPX-menetelmän kinetiikkaa eli kuinka kauan reaktion alusta signaali nousee. Tutkittiin kinetiikkaa kun käytettiin BF530-leimattua vasta-ainetta sekä BF530-leimattuja nanopalloja. Pipetoitiin H117-koutattuja mikropalloja $5 \cdot 10^4$ kpl/kuoppa ja palloliuosta pipetoitiin 10 μ l jokaiseen kuoppaan. PSA:n pitoisuus kuopassa oli joko 0 tai 1 ng/ml ja sitä pipetoitiin 5 μ l jokaiseen kuoppaan. BF530-leimatun vasta-aineen pitoisuus oli 3 ng/kuoppa ja BF530-leimattuja nanopalloja käytettiin $5 \cdot 10^7$ kpl/kuoppa. Molempia pipetoitiin 5 μ l haluttuihin kuoppalevyn kuoppiin. Signaalia mitattiin TPX-laitteella, kunnes signaalit tasaantuivat. (LIITE 12 ja 13)

Tehtiin TPX-menetelmästä standardisuorat, kuten heterogeenisestä menetelmästäkin. Käytettiin 20 % mediumipitoisuutta. Vasta-aineella H117 päällystettyjä mikropalloja käytettiin $5 \cdot 10^4$ kpl/kuoppa ja jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 10 μ l palloliuosta. PSA:n pitoisuudet olivat 0; 0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 ja 30 ng/ml. Jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 5 μ l haluttua PSA:n ja mediuminliuosta. BF530-leimattuja nanopalloja käytettiin jokaisessa kuopassa $5 \cdot 10^7$ kpl. LnCap-solulinjan näytteeseen ei lisätty PSA:ta ja se laimennettiin 1/5-osaan alkuperäisestä. (LIITE 14)

7 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

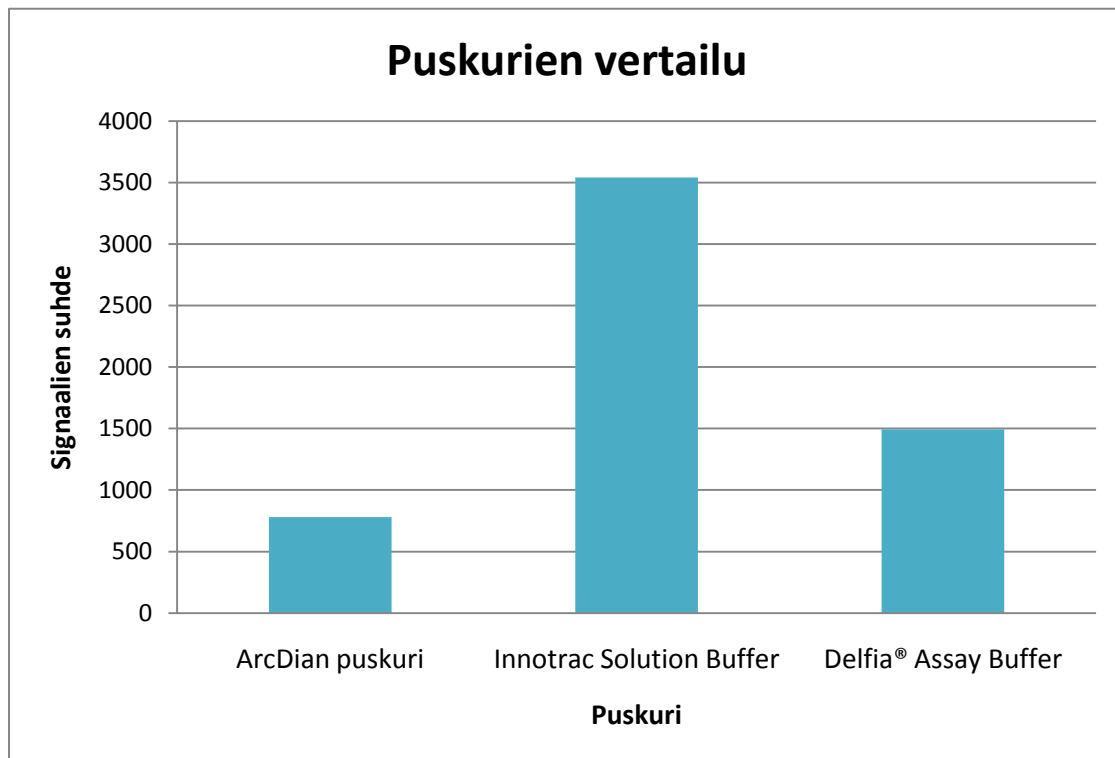
7.1 Heterogeeninen, ei-kilpaileva immunomääritys

Liitteen 1 tuloksista voitiin päätellä, että heterogeenisen, ei-kilpailevan immunomäärityksen taustasignaali on melko korkea, joten tätä pyrittiin alentamaan komponenttien optimoinnilla. Tuloksista nähtiin kuitenkin se, että tulevissa mittauksissa voitaisiin käyttää PSA-pitoisuutena 0,1 ng/ml, koska tämä erottui oikein hyvin taustasignaalista. Korkeampien pitoisuuksien (1 ng/ml ja 10 ng/ml) signaalit olivat liian korkeita. Ensimmäisenä optimoitiin Eu-leimattujen, 5A10-päällystettyjen nanopallojen määrä. Ensimmäisessä testissä käytettiin palloja $5 \cdot 10^8$ kpl kpl/kuoppa. Liitteen 2 tuloksista voitiin päätellä, että sopiva pallomäärä olisi $3 \cdot 10^7$ kpl/kuoppa, koska tällöin taustasignaali on alhainen ja 0,1 ng/ml:n PSA-pitoisuus erottuu taustasta oikein hyvin.

Tehtyjen testien perusteella todettiin, että streptavidinilla päällystetty 96-kuoppalevy toimii määrytyksissä paremmin kuin 96-kuoppalevy, jonka kuoppiin oli suoraan kiinnitetty vasta-aine H117. Tämä johtui siitä, että streptavidinin ja biotiinin sidos on yksi vahvimmista olemassa olevista kemiallisista sidoksista. Testeissä käytettiin biotinyloitua vasta-ainetta H117, jotta tällainen vahva sidos saataisiin muodostettua. Koska vasta-aine H117 ei ollut enää valmiiksi kiinnitettynä 96-kuoppalevyn pohjaan, sen pitoisuus reaktiossa oli optimoitava. Liitteestä 3 voidaan todeta, että paras PSA:n signaalin ja taustasignaalin suhde saadaan, kun käytetään yhdessä kuopassa 30 ng biotinyloitua vasta-ainetta H117. Korkeammilla vasta-aineen pitoisuuksilla (100 ng/kuoppa ja 300 ng/kuoppa) saadut signaalit pysyivät samana, joten tämänkin vuoksi pitoisuuden 30 ng/kuoppa käyttö oli perusteltua.

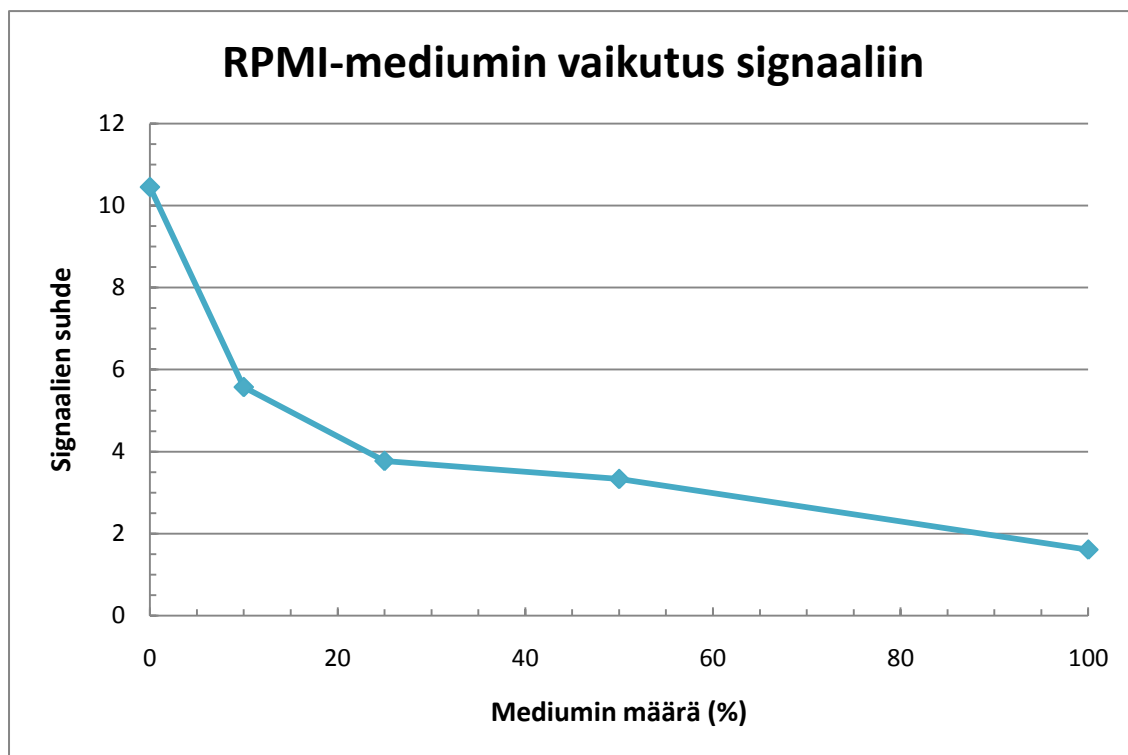
Testattiin, miten eri puskurit vaikuttavat reaktioon. Käytettiin kolmea eri puskuria, jotka olivat Delfia[®] Assay Buffer (pH 7,8), ArcDian puskuri (pH 8,0) sekä Innotrac Solution Buffer (punainen). Näiden vaikutukset signaaliin löytyvät liitteestä 4. Kun käytettiin PSA:n pitoisuutta 10 ng/ml, paras signaalin ja taustan suhde saatiin, kun käytettiin Innotracin puskuria. Se antoi ylivoimaisesti

matalimman taustasignaalin. Sen antaman taustan ja PSA:n signaalin suhde oli noin 3500, kun sama suhde Delfia® Assay Bufferia käytettäessä oli noin 1500 (kuva 9).

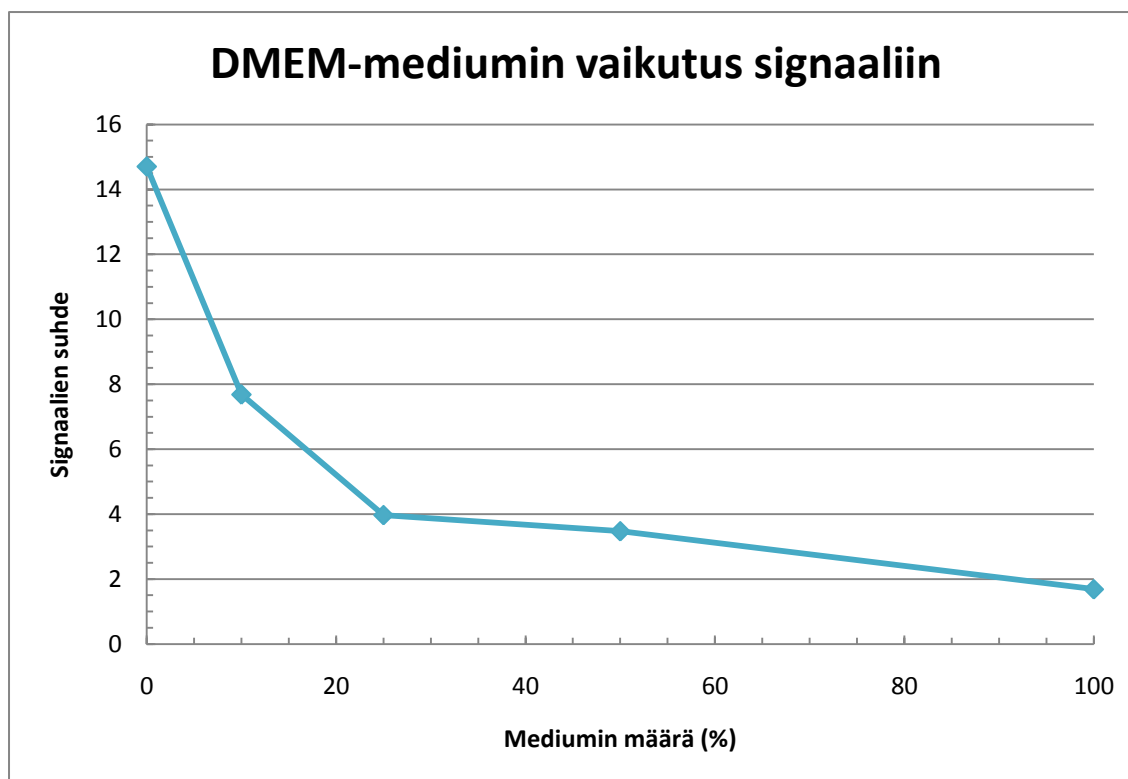


Kuva 9. Puskurien vertailu.

Testattiin myös, miten kasvatusmediumin ja solujen määrä vaikuttavat tämän menetelmän saatuihin signaaleihin. Tätä tutkittiin kahdella eri kasvatusmediumilla, jotka olivat DMEM + 10 % iFBS + penisilliini/streptomysiini + L-glutamiini sekä RPMI-1640, jossa oli L-glutamiinia + 15 % iFBS + penisilliini/streptomysiini + 1 mM natriumpuryvaattia + 10 mM Hepes. Kuvassa 10 on esitetty taustasignaalin ja PSA-pitoisuudesta 0,1 ng/ml saadun signaalin suhde eri mediumpitoisuuksilla käytettäessä RPMI-mediumia ja kuvassa 11 on sama suhde, kun käytettiin DMEM-mediumia.



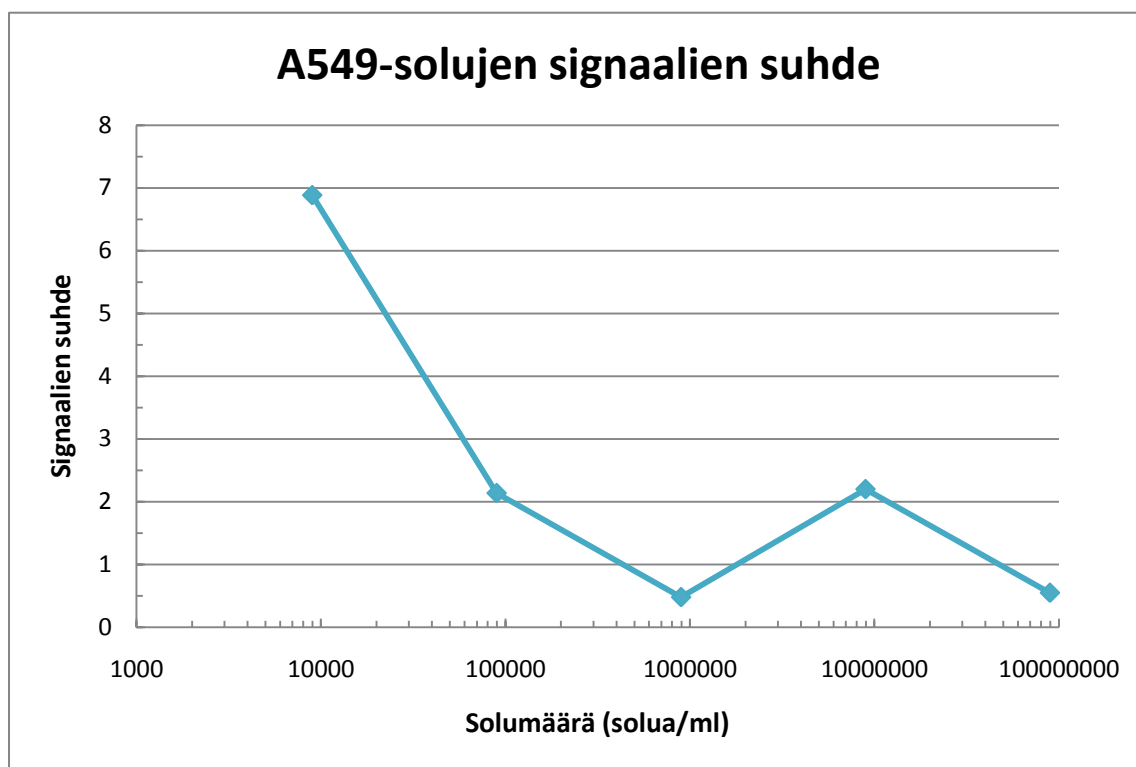
Kuva 10. RPMI-mediumin vaikutus signaaliin.



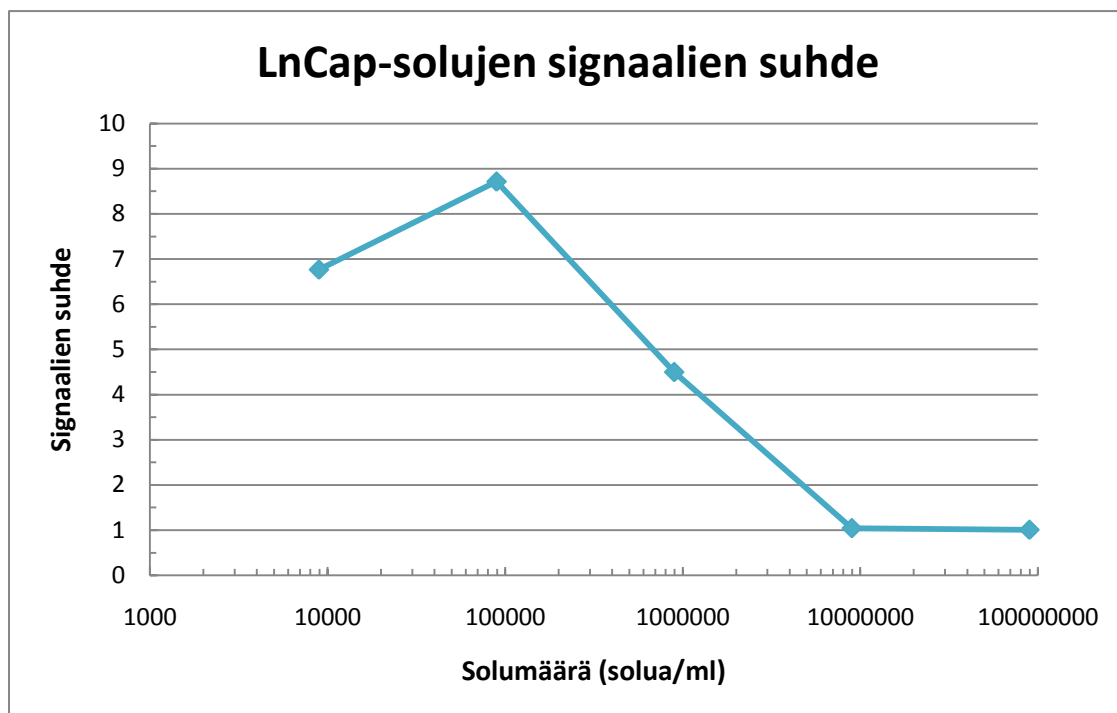
Kuva 11. DMEM-mediumin vaikutus signaaliin.

Kuvista 10 ja 11 nähdään, että mediumin määrän noustessa, signaalien suhde laskee eli PSA ei erotu enää yhtä hyvin taustasignaalista. Kuvista nähdään myös, että kun mediumia on 20 %, erottuu PSA taustasignaalista vielä hyvin, joten suurin sallittu määrä mediumia reaktiossa on 20 %, jolloin se ei vielä merkittävästi häiritse saatua signaalia. Liitteestä 5 nähdään, että taustasignaali oli melko korkea, mutta tämä johtui käytettyjen nanopallojen määrästä, joka oli $3 \cdot 10^8$ kpl/kuoppa.

Tutkittiin, miten reaktiossa olevat solut vaikuttavat menetelmän herkkyyteen. Käytettiin vaihtelevaa solumäärää ja PSA-pitoisuuksia 0 ng/ml ja 0,1 ng/ml. Mittausten tulokset löytyvät liitteestä 6. Kuvassa 12 on esitetty taustasignaalin ja PSA:n signaalin suhde eri solumäärillä, kun käytettiin kontrollisoluja A549 ja kuvassa 13 on sama suhde, kun soluina käytettiin LnCap-solulinjan soluja.



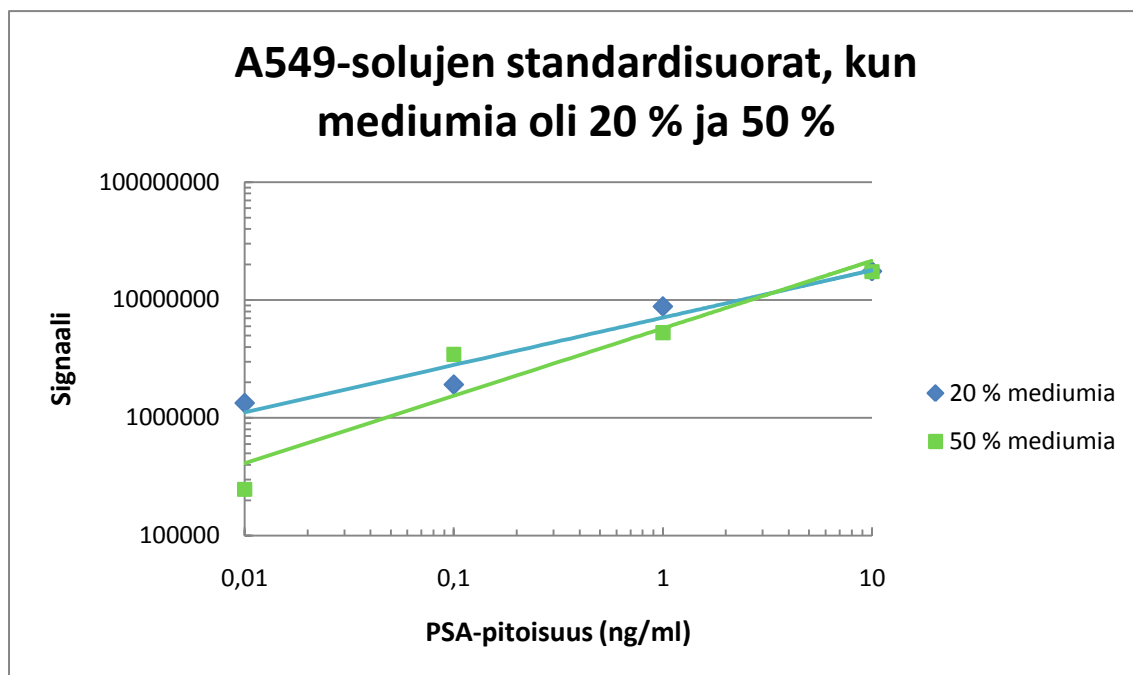
Kuva 12. A549-solujen signaalien suhde.



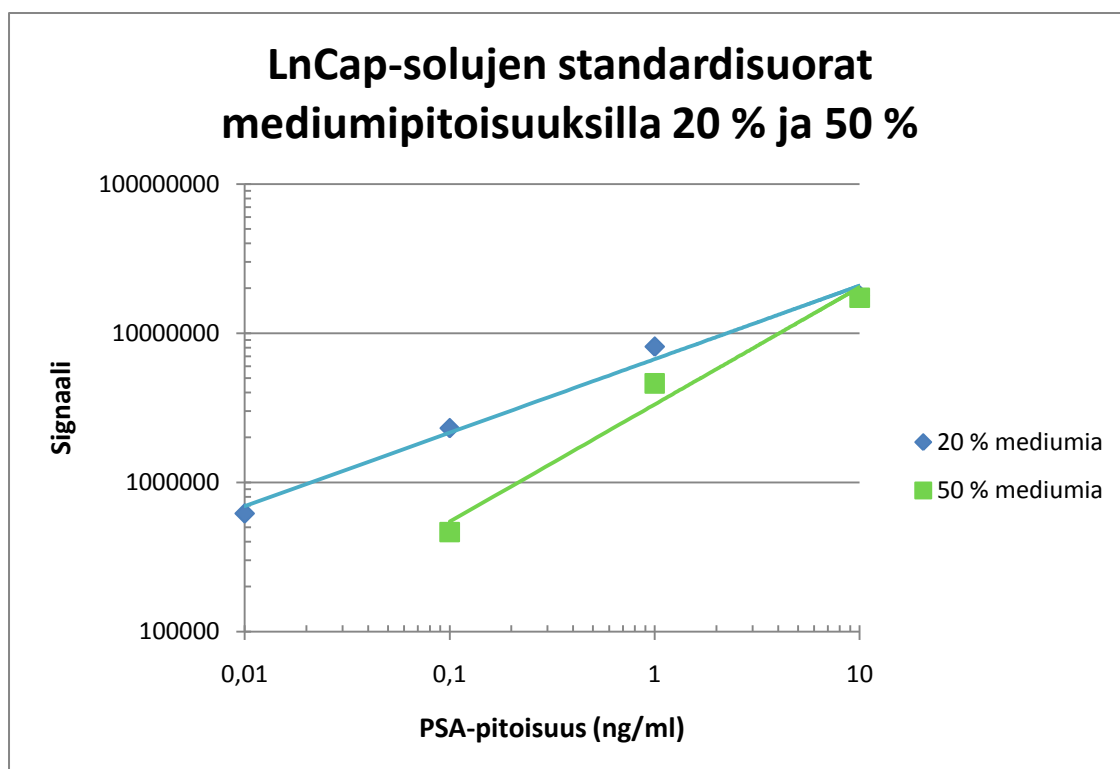
Kuva 13. LnCap-solujen signaalien suhde.

Kuvista 12 ja 13 nähdään, että solumäärän noustessa korkeaksi, PSA:n signaali ei erotu kovin hyvin taustasignaalista. Mikäli soluja on mukana reaktiossa, tulee menetelmästä samalla epästabiilimpi. Tämän vuoksi olisikin hyvä, jos tutkittavat solut erittäisivät PSA:ta kasvatusmediumiinsa, jolloin tästä voitaisiin tutkia PSA:n pitoisuutta.

Seuraavaksi tutkittiin erittävätkö LnCap-solut kasvatusmediumiinsa. Kontrollina käytettiin A549-soluja, joiden ei pitäisi erittää PSA:ta ulkopuolelleen. Tutkittiin tätä sekä 20 % että 50 % mediumipitoisuuksilla. Kuvassa 14 ja 15 on esitetty saadut standardisuorat, kun käytettiin 20 % ja 50 % puhdasta mediumia reaktiossa. Kuvan 14 suorat tehtiin kontrollisolujen mediumilla (RPMI-1640, jossa oli mukana L-glutamiinia + 10 iFBS + penisilliini/streptomysiini) ja kuvan 15 suora tehtiin LnCap-solujen mediumilla (RPMI-1640, jossa oli mukana L-glutamiinia + 15 % iFBS + penisilliini/streptomysiini + 1 mM natriumpuryvaattia + 10 mM Hepes). Suorilta pystyttiin katsomaan erittykö soluista ulos PSA:ta, ja jos niin kuinka paljon.



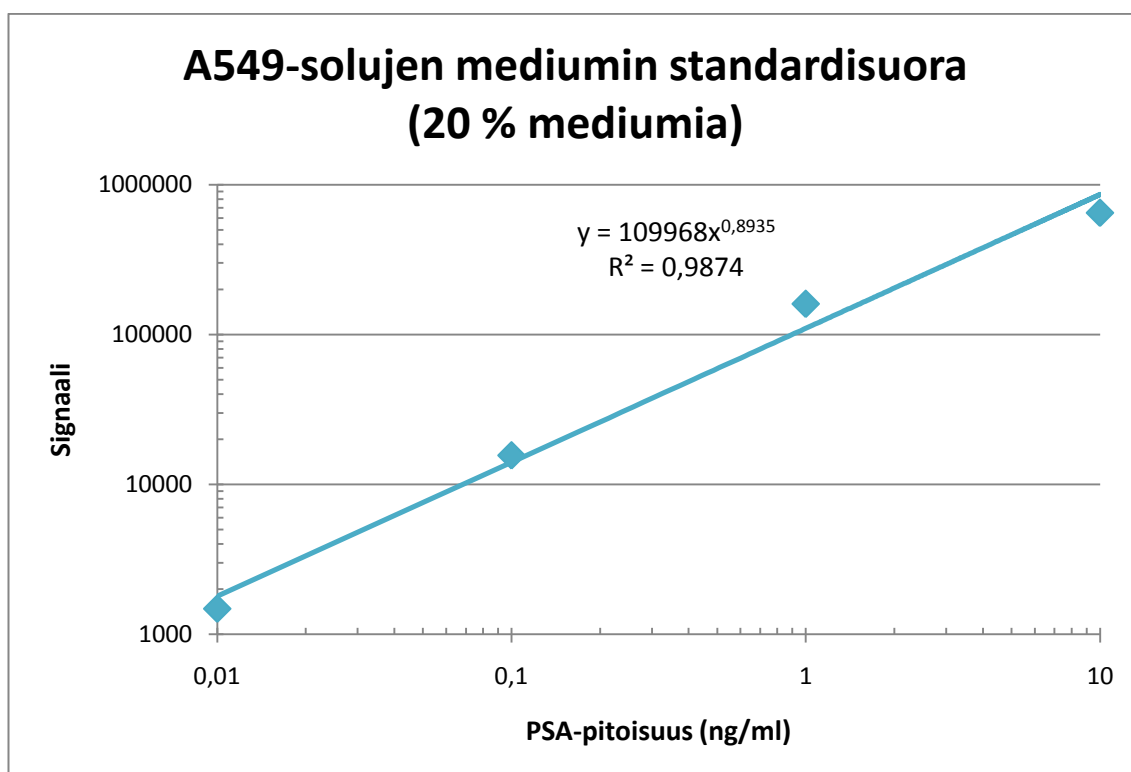
Kuva 14. A549-solujen standardisuorat, kun mediumia oli 20 % ja 50 %.



Kuva 15. LnCap-solujen standardisuorat mediumipitoisuuksilla 20 % ja 50 %.

Liitteen 7 tuloksista nähdään, että A549-solujen näytteiden signaalit ovat 20 % mediumpitoisuudessa 76243 ja 50 % mediumpitoisuudessa 213216,5. Tämän perusteella A549 solut erittäisivät hieman PSA:ta ulos kasvatusmediumiinsa, vaikka niiden ei pitäisi. Tämä määrä on kuitenkin alle 0,1 ng/ml. LnCap-solunäytteiden pitoisuudet menivät mittausrajan yli, joten testi piti tehdä uudelleen, ja LnCap-solunäytteitä laimentaa.

Uusittu A549-solujen standardisuora on esitetty kuvassa 16. Tällä kertaa mediumpitoisuutena käytettiin ainoastaan 20 %, koska edellisessä testissä kävi ilmi, että 20 %:a käytettäessä menetelmä on stabiilimpi.

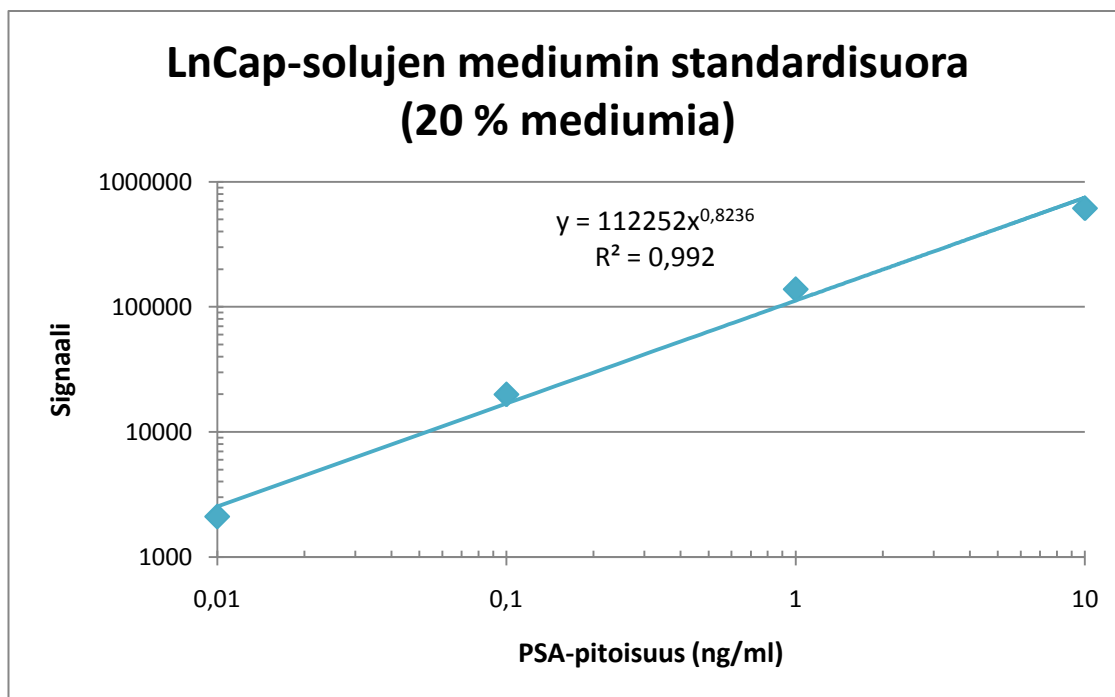


Kuva 16. A549-solujen mediumin standardisuora (20 % mediumia).

Kuvassa 16 on esitetty myös suoran R^2 ja suoran yhtälö, jonka perusteella voidaan laskea menetelmän herkkyys ja näytteissä olevan PSA:n määrä. Pienin määrä PSA:ta, jonka tämä menetelmä A549-solujen mediumia käytettäessä havaitsisi, olisi 0,001697 ng/ml eli noin 1,7 pg/ml. Ja tämän mittauksen perusteella A549-solunäytteen signaali oli 277. Suoran yhtälön perusteella PSA:ta oli tällöin havaittavissa 1,2 pg/ml. Menetelmä ei kuitenkaan tätä pystyisi

havaitsemaan, joten PSA A549-solunäytteessä oli 0 pg/ml, kuten pitäisikin. Tällainen pieni ero voi syntyä esimerkiksi pipetoinnissa, koska pipetoitavat määrät ovat hyvin pieniä.

Kuvassa 17 on esitetty uusittu LnCap-solujen standardisuora. Siinä on käytetty LnCap-mediumin pitoisuutena 20 %, kuten A549-mediumin pitoisuutenakin.



Kuva 17. LnCap-solujen mediumin standardisuora (20 % mediumia).

Kuvassa 17 on kuvan 16 tapaan esitetty sekä suoran R^2 että yhtälö. Ja samaan tapaan voidaan laskea tämän menetelmän herkkyys käyttäessä LnCap-mediumia. Menetelmän herkkyydeksi saatiin laskettua 0,0005341 ng/ml eli noin 0,5 pg/ml. Laimennettujen LnCap-solunäytteiden signaalien perusteella saatiin laskettua paljonko solut erittävät PSA:ta mediumiinsa. Kun solujen kasvatusmediumia oli reaktiossa mukana 20 %, oli PSA:ta havaittavissa keskimäärin 80 ng/ml.

Lopullinen protokolla, joka antoi parhaat tulokset, oli seuraavanlainen:

Streptavidin 96-kuoppalevy pestiin kaksi kertaa

30 ng biotinyloitua vasta-ainetta H117 (40 µl/kuoppa)

30 min inkubointi, jonka jälkeen levy pestiin kaksi kertaa
 PSA:n lisäys (0 ja 0,1 ng/ml) tai näytteet (40 µl/kuoppa)
 30 min inkubointi, jonka jälkeen levy pestiin kaksi kertaa
 $3 \cdot 10^7$ kpl vasta-aineella 5A10 päällystettyjä, Eu-leimattuja nanopalloja (\varnothing 0,92 nm) (40 µl/kuoppa)
 1h inkubointi, jonka jälkeen levy pestiin kuusi kertaa.

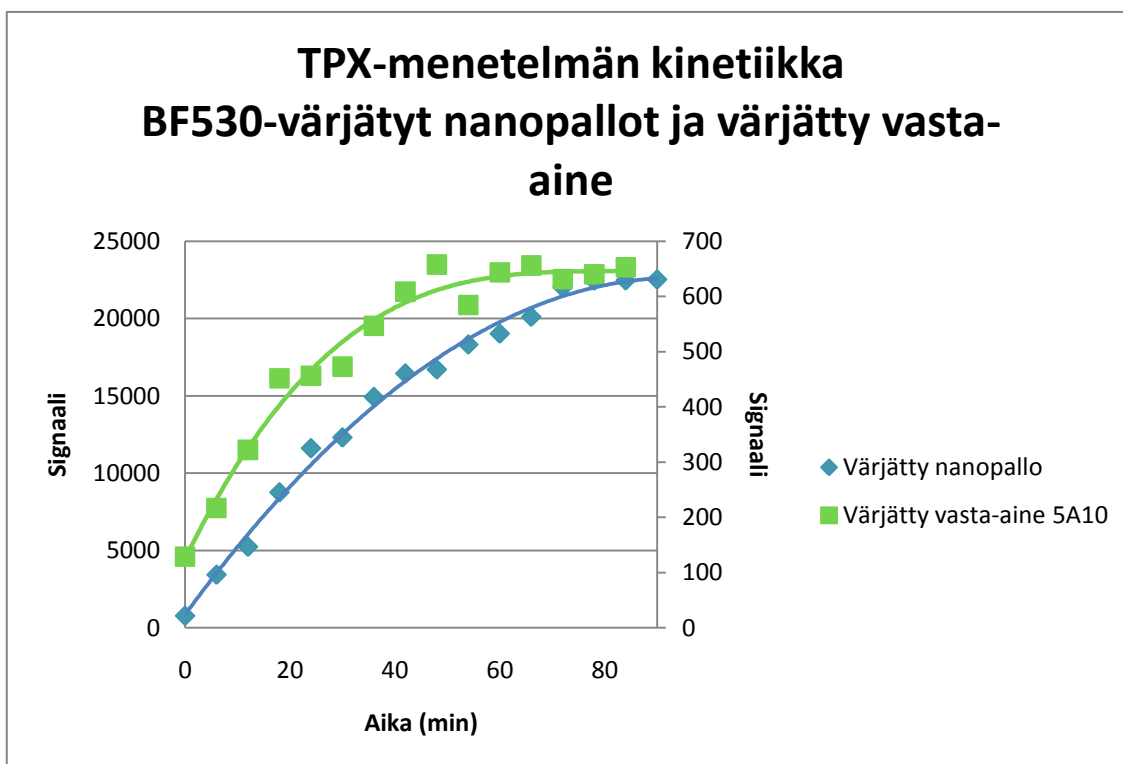
7.2 TPX-menetelmä

TPX-menetelmä on homogeeninen määrittäminen eli se on nopeampi suorittaa kuin heterogeeninen määrittäminen. Ensimmäisenä piti optimoida vasta-aineiden H117 ja 5A10 määrät. Mittaustulokset löytyvät liitteestä 9. Tuloksista nähdään, että sitoutumista ei ole tapahtunut, koska taustasignaali ja PSA:n mitattu signaali on lähestulkoon sama. Tuloksista voitiin kuitenkin päätellä sen verran, että kun molempien vasta-aineiden määrä yhdessä kuopassa on 3 ng, niin taustasignaali on vielä alhainen (~ 250). Koska sitoutumista ei ollut tapahtunut, piti testata, mitä komponentti ei toimi. Tulokseksi saatiin, että streptavidinilla päällystetyt mikropallot eivät toimisi halutulla tavalla. Seurauksena päätettiin kiinnittää vasta-aine H117 suoraan kiinni mikropalloihin. Testattiin toimivatko mikropallot nyt ja liitteestä 10 käy ilmi, että tällä kertaa sitoutumista oli tapahtunut eli mikropallot toimivat. Testissä käytettiin PSA-pitoisuutta 10 ng/ml, koska haluttiin olla varmoja, että PSA:n signaali erottuisi taustasta, jos sitoutumista tapahtuisi.

TPX-menetelmässä käytettiin sekä suoraan leimattua vasta-ainetta 5A10 sekä nanopalloja, jotka olivat BF530-leimattuja ja joihin vasta-aine 5A10 oli kiinnitetty suoraan. Näiden nanopallojen määrä oli myös optimoitava. Mittaustulokset löytyvät liitteestä 11. Tuloksista nähtiin, että optimaalinen nanopallojen määrä olisi välillä $3 \cdot 10^7$ - $1 \cdot 10^8$ kpl/kuoppa. Päädyttiin käyttämään nanopallo määrää $5 \cdot 10^7$ kpl/kuoppa, koska tällöin voitiin olettaa taustasignaalin olevan tarpeeksi alhainen ja PSA:n signaali erottuisi siitä oikein hyvin. Liitteen 11 tuloksista nähdään myös, että ArcDian puskuri toimi määrittäksessä paremmin kuin

Innotracin puskuri, jota käytettiin heterogeenisessä määrittäyksessä. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että Innotrac-puskurin punainen väri häiritsi mittausta.

Tutkittiin TPX-menetelmän kinetiikkaa eli miten saadut signaalit kehittyvät ajan kuluessa. Tutkittiin molempien menetelmien kinetiikkaa eli kun käytettiin suoraan leimattua vasta-ainetta 5A10 ja nanopalloihin kiinnitettyä vasta-ainetta 5A10. Mittaustulokset ovat liitteissä 12 ja 13. Kuvassa 18 on esitetty menetelmän kinetiikka, jossa käytettiin suoraan leimattua vasta-ainetta ja nanopalloon kiinnitettyä vasta-ainetta. Molemmissa käytettiin PSA-pitoisuutta 1 ng/ml.

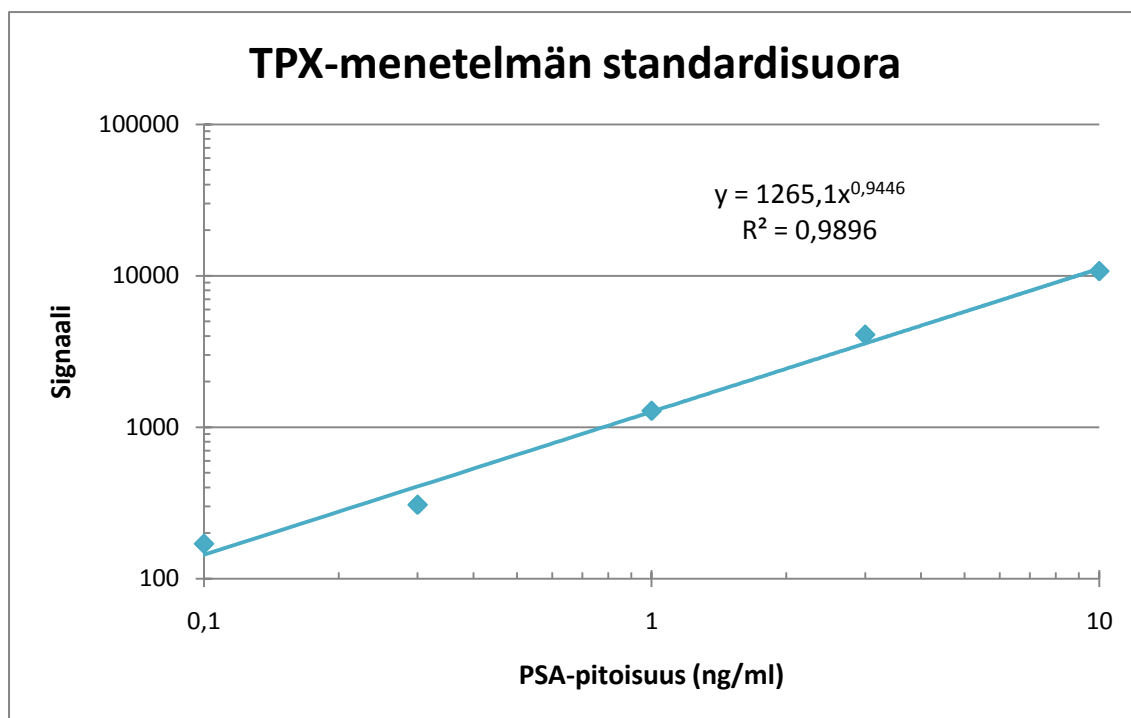


Kuva 18. TPX-menetelmän kinetiikka, kun käytettiin BF530-värjättyä vasta-ainetta 5A10 sekä BF530-värjättyjä nanopalloja. Vasen akseli on nanopalloille ja oikea suoraan värjättylle vasta-aineelle.

Kuvasta 18 nähdään, että käytettäessä leimattua vasta-ainetta signaali alkaa tasoittua noin 50 minuutin kuluttua komponenttien lisäyksen jälkeen. Täysin tasaantunut signaali on noin 65 minuutin jälkeen. Signaalit jäävät kuitenkin hyvin alhaisiksi. Kun käytettiin BF530-leimattuja nanopalloja, signaalien

tasoittumiseen meni enemmän aikaa, ja vasta noin 80 minuutin jälkeen se alkoi tasoittua. Signaalit ovat kuitenkin paljon korkeammat, kun käytetään BF530-leimattuja nanopalloja, joihin on kiinnitetty vasta-aine 5A10. Tämän perusteella toimivammaksi menetelmäksi osoittautui menetelmä, jossa käytettiin nanopalloja.

Kuten heterogeenisestä määrittämisestä, myös tästä määrittämisestä tehtiin standardisuora, jonka perusteella voitiin laskea menetelmän herkkyys sekä paljonko näytesolujen mediumissa oli PSA:ta. Standardisuora on esitetty kuvassa 19.



Kuva 19. TPX-menetelmän standardisuora, kun käytettiin BF530-värjättyjä nanopalloja.

Standardisuora on tehty liitteen 14 mittaustuloksista. Suoran yhtälön avulla voidaan laskea menetelmän herkkyys, joka on 0,08841 ng/ml eli noin 0,09 ng/ml. LnCap-solunäytteen signaaliksi saatiin 20319, joka vastaa noin 90 ng/ml eli solujen mediumissa olisi noin 90 ng/ml PSA:ta.

Protokolla, johon komponenttien optimoinnilla päädyttiin, oli seuraavanlainen:

Musta 384-kuoppalevy

$5 \cdot 10^4$ kpl vasta-aineella H117 päällystettyjä mikropalloja, Ø 3,098 µm (10 µl/kuoppa)

PSA:n (0 ja 1 ng/ml) tai näytteiden lisäys (5 µl/kuoppa)

$5 \cdot 10^7$ kpl BF530-leimattuja, vasta-aineella 5A10 päällystettyjä nanopalloja (5 µl/kuoppa).

8 POHDINTA

Työn tarkoituksena oli kehittää herkkä menetelmä PSA:n havaitsemiseksi. Tutkimukseen käytettiin kahta eri menetelmää; heterogeenista ja TPX-määritystä. Menetelmissä käytettävien komponenttien optimoinnilla oli suuri merkitys mittauksissa saatavaan taustasignaaliin. Kun kaikkien komponenttien määrät olivat mahdollisimman optimaalisia, ei määrittelyn taustasignaali noussut kovin korkeaksi. Tällöin voidaan sanoa, että ylimääräiset häiriötekijät saatiin poistettua määrittelyksistä. Kun taustasignaali saatiin alhaiseksi, pystyttiin havaitsemaan mataliakin PSA-pitoisuuksia helposti.

TPX-menetelmän herkkyudeksi saatiin noin 90 pg/ml. Heterogeenisen määrittelyn herkkyudeksi saatiin huomattavasti parempi luku eli noin 0,5 pg/ml. Tämän perusteella heterogeeninen määrittely tunnistaa herkemmin mediumissa olevaa PSA:ta kuin TPX-määrittely. Näytemäärien ei tarvitse olla suuria, jotta määrittely voidaan suorittaa. Tämän vuoksi potilaan ei tarvitsisi antaa suuria näytemääriä, vaan ohutneula näyte riittäisi. Tästä pystyttäisiin tutkimaan onko veressä PSA:ta ja kuinka paljon.

Näitä testausmenetelmiä voitaisiin soveltaa niin eturauhas- kuin rintasyövän diagnosointiin. Tutkimukset ovat osoittaneet, että joissakin rintasyöpätapauksissa PSA:n arvo on ollut koholla. Koska eturauhas- ja rintasyöpä ovat maamme yleisimpiä syöpäsairauksia, olisi tarpeellista saada kehitetyksi mahdollisimman herkkä menetelmä, jolla PSA:ta pystyttäisiin havaitsemaan ja näin ollen nämä syövät havaittaisiin jo mahdollisimman alkuvaiheessa.

Tyypillisesti PSA:ta on löydetty rintasyöpäpotilaista yli 0,3 ng/ml. Noin 30 %:lla tutkituista potilaista löydettiin tämän pitoisuuden ylittävä määrä PSA:ta. (36) Tästä johtuen tutkimuksiin käytettävän menetelmän tulisi havaita vähintään 0,3 ng/ml PSA-pitoisuuden. Molemmilla menetelmillä pystyttäisiin havaitsemaan tämä määrä PSA:ta, joten tässä suhteessa molemmat menetelmät olisivat käyttökelpoisia.

Ajallisesti TPX-menetelmä on nopeampi kuin heterogeeninen määrittäminen. Erona näissä menetelmissä on käytettävät nanopallot. Heterogeenisessä määrittämisessä käytettiin europium-leimattuja nanopalloja, kun TPX-menetelmässä käytettiin BF530-leimattuja nanopalloja. TPX-menetelmää ei testattu ollenkaan europium-leimatuilla nanopalloilla. Vaikka korkein signaali TPX-määrittämisessä saatiin vasta noin 80 minuutin kuluttua komponenttien lisäämisen jälkeen, ei sen signaali silti yltänyt heterogeenisen määrittäksen tasolle. Heterogeeniseen määrittämiseen menee aikaa noin 2-3 tuntia ja mikäli vasta-aine 5A10 ei olisi kiinnitetty nanopalloon, niin vieläkin enemmän, koska tarvittaisiin yksi pesuvaihe lisää.

Menetelmiä ei päästy testaamaan oikeilla syöpäsolunäytteillä, joten ei pystytä täysin varmasti sanomaan, miten määrittäykset käyttäytyvät tällöin. Määrittäysten kehitysvaiheessa pyrittiin kuitenkin simuloimaan oikeanlaista tilannetta.

Heterogeenista määrittäystä voitaisiin kehittää vielä eteenpäin käyttämällä erilaisia affiniteettipuhdistuspintoja, joilla voitaisiin menetelmästä saada vieläkin herkempi. Näiden pintojen avulla sitoutuminen kaivon pohjaan voisi olla tehokkaampaa, jolloin muodostuneesta komponentista saatava signaali nousisi ja taustasignaali pienenesi. Joitakin affiniteettipuhdistuspintoja ehdittiin testaamaan, mutta niiden osuus jätettiin tästä työstä pois. Näistä testeistä saatujen tulosten mukaan affiniteettipuhdistuspintoja kannattaisi tutkia lisää, koska niitä käytettäessä signaalien suhde oli parempi.

LÄHTEET

1. Stephan C, Jung K, Diamandis EP, Rittenhouse HG, Lein M, Loening SA. (2002) Prostate-specific antigen, its molecular forms, and other kallikrein markers for detection of prostate cancer. *Urology* 59 and 2-8.
2. Finne P, Zhang WM, Auvinen A, et al. (2000) Use of the complex between prostate specific antigen and alpha 1-protease inhibitor for screening prostate cancer. *Urology* 164 and 1956-1960.
3. Soukka, T. (2003) Immunoassay designs and potential of particulate photoluminescent lanthanide reporters. Turun yliopisto.
4. Manz, A., Pamme, N., Iossifidis, D. (2003) *Bioanalytical Chemistry*, World Scientific Publishing Company,.
5. Mitä nanoteknologia on? [Online] [Viitattu: 15. 3. 2010.]
<http://akseli.tekes.fi/opencms/opencms/OhjelmaPortaali/ohjelmat/NANO/fi/tekno.html>.
6. Kirjavainen, J., (2008) Proteiiniipitoisuuden määrittämenetelmän kehittäminen. Opinnäytetyö. Turun ammattikorkeakoulu, Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma.
7. Valanne, A. (2009) Nanoparticle labels in bioaffinity assays. Turun yliopisto.
8. Method and use of nanoparticles to bind biocides in paints. [Online] [Viitattu: 15. 3. 2010.] <http://www.freepatentsonline.com/7662222.html>.
9. Torchilin, V.P. (2006) *Nanoparticulates as Drug Carriers*. Imperial College Press. Lontoo.
10. Mikkelsen, S.R and Cortón, E. (2004) *Bioanalytical Chemistry*. John Wiley & Sons. Inc. Hoboken, NJ, USA : s.n.

11. Toivonen, R. (2006) Proteiini- ja solukonsentraatiomittaukset kaksoisfotoniviritteisellä fluorometrillä. Opinnäytetyö. Turun ammattikorkeakoulu. Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma.
12. Soini, J. (2002) Development of instrumentation for single-step, multiplexed, microvolume bioaffinity assays. Turun yliopisto.
13. Soini, S.T., Waris M.E. & Hänninen P.E. (2004) Detection methods of microsphere based single-step bioaffinity and in vitro diagnostics assays. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 34. 753-760.
14. Rintasyöpä, [online, viitattu 31.3.2010] Saatavilla [www-muodossa: http://www.rintasyopa.fi](http://www.muodossa: http://www.rintasyopa.fi).
15. Rintasyöpä, Terveyskirjasto [online, viitattu 18.1.2010] Saatavilla [www-muodossa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00618](http://www.muodossa: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00618).
16. Rintasyöpä, Polikliinikka.fi [online, viitattu 31.3.2010] Saatavilla [www-muodossa: http://www.poliklinikka.fi/?page=3751315&id=9721391](http://www.muodossa: http://www.poliklinikka.fi/?page=3751315&id=9721391).
17. Stephan P. (2008) Breast Biopsy Overview Four Types of Procedures [online, viitattu 31.3.2010]. Saatavilla [www-muodossa: http://breastcancer.about.com/od/breastbiopsy/a/biopsy_overview.htm](http://www.muodossa: http://breastcancer.about.com/od/breastbiopsy/a/biopsy_overview.htm).
18. Tumor Markers [online, viitattu 19.5.2010] Saatavilla [www-muodossa: http://www.labtestsonline.org/understanding/analytes/tumor_markers/glance.html](http://www.muodossa: http://www.labtestsonline.org/understanding/analytes/tumor_markers/glance.html).
19. Tumor Markers, What are tumor markers? [online, viitattu 19.5.2010] Saatavilla [www-muodossa: http://www.cancer.org/docroot/ped/content/ped_2_3x_tumor_markers.asp](http://www.muodossa: http://www.cancer.org/docroot/ped/content/ped_2_3x_tumor_markers.asp).
20. CA 15-3 antigeeni, [online, viitattu 31.3.2010] Saatavilla [www-muodossa: http://oyslab.fi/ohjekirja/3587.html](http://www.muodossa: http://oyslab.fi/ohjekirja/3587.html).

21. CA15-3 Antigeeni, seerumista [online, viitattu 19.5.2010] Saatavilla [www-](http://www.muodossa: http://www.huslab.fi/ohjekirja/3587.html)
muodossa: <http://www.huslab.fi/ohjekirja/3587.html>.
22. Prostate-Specific Antigen [online, viitattu 15.5.2010] saatavilla [www-](http://www.muodossa: http://emedicine.medscape.com/article/457394-overview#section~CharacteristicsofProstateSpecificAntigen)
muodossa: <http://emedicine.medscape.com/article/457394-overview#section~CharacteristicsofProstateSpecificAntigen>.
23. The world of laboratories [online, viitattu 15.5.2010] Saatavilla [www-](http://www.muodossa: http://www.labome.com/review/gene/354/prostate%20specific%20antigen/antibody/all%20methods)
muodossa:
<http://www.labome.com/review/gene/354/prostate%20specific%20antigen/antibody/all%20methods>.
24. Diamandis, P. (1998) Prostate-specific Antigen: Its Usefulness in Clinical Medicine. Trends in Endocrinology and Metabolism. Vol. 9, No. 8.
25. Diagnostiikka 2000-teknologiaohjelma 2000-2003, teknologiaohjelmaraportti, 4/2004, TEKES, Helsinki.
26. Glick B., Pasternak J. (2003) Molecular biotechnology, principles and applications of recombinant DNA, Third edition, Washington D.C.
27. Lepomäki, V. (2005) Optinen solulukija. Pro Gradu -työ, Turun yliopisto, Fysiikan laitos.
28. Hemmillä, I., Ståhlberg, T., Mottram, P. (1994) Bioanalytical applications of labelling technologies. A review of trends and opportunities in biospecific assay, based on the product offering of Wallac, an EG&G company. Wallac, Turku.
29. Chasteen, T. Jablonski Diagram [online, viitattu 19.5.2010]. Saatavilla [www-](http://www.muodossa: www.shsu.edu/~chemistry/chemiluminescence/JABLONSKI.html)
muodossa: www.shsu.edu/~chemistry/chemiluminescence/JABLONSKI.html.
30. Albani, J., (2008) Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy. John Wiley & Sons, Ltd.

31. Ninfa, A., Ballou, D., (1998) Fundamental laboratory approaches for Biochemistry and Biotechnology, University of Michigan, Fitzgerald science Press, Inc.
32. Hänninen, P., Soini, A. et al. (2000) A new microvolume technique for bioaffinity assays using two-photon excitation, Nature America inc. 2/2000, ss. 548-550.
33. Lemercier, G., Johnsson, K., (2006) Chimeric streptavidins with reduced valencies, Nature methods, 4/2006, ss. 247-248.
34. Human Metabolome Database [online, viitattu 20.5.2010], Saatavilla [www-muodossa: http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00030](http://www.muodossa: http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00030).
35. Streptavidin [online, viitattu 20.5.2010] Saatavilla [www-muodossa: http://www.prozyme.com/documents/sa10.pdf](http://www.muodossa: http://www.prozyme.com/documents/sa10.pdf).
36. H Yu, M Gai, EP Diamandis, D Katsaros et al. (1995) Prostate-specific antigen is a new favorable prognostic indicator for women with breast cancer, Cancer research 55, 2104-2110.

PSA:n määrän vaikutus signaaliin. Vasta-aine H117 oli kiinnitettynä mikrotiitterilevyn kaivon pohjaan ja vasta-aineella 5A10-päällystettyjä, Eu-leimattuja palloja käytettiin $5 \cdot 10^8$ kpl/kuoppa.

Fluoresenssi	Keskiarvo	PSA:n määrä
84928 71130 73638	76565	0 ng/ml PSA
245748 434788 484879	388472	0,1 ng/ml PSA
2974839 1457447 2106676	2179654	1 ng/ml PSA
9227685 14456840 16072482	13252336	10 ng/ml PSA

Eu-leimattujen, 5A10-päällystettyjen nanopallojen määrän optimointi. Vastaine H117 oli kiinnitettynä mikrotiitterilevyn kaivon pohjaan.

Fluoresenssi	Keskiarvo	PSA:n ja Eu-pallojen määrä
166 161	164	0 ng/ml PSA, $1 \cdot 10^7$ Eu-palloa
3017 3793	3405	0,1 ng/ml PSA, $1 \cdot 10^7$ Eu-palloa
561 470	516	0 ng/ml PSA, $3 \cdot 10^7$ Eu-palloa
8039 8151	8095	0,1 ng/ml PSA, $3 \cdot 10^7$ Eu-palloa
3889 3520	3705	0 ng/ml PSA, $1 \cdot 10^8$ Eu-palloa
16841 19448	18145	0,1 ng/ml PSA, $1 \cdot 10^8$ Eu-palloa
24999 25405	25202	0 ng/ml PSA, $3 \cdot 10^8$ Eu-palloa
116842 223223	170033	0,1 ng/ml PSA, $3 \cdot 10^8$ Eu-palloa

Biotinoidun vasta-aineen H117 määrän optimointi. Eu-leimattuja, 5A10-päällystettyjä nanopalloja oli $3 \cdot 10^7$ kpl/kuoppa.

Fluoresenssi	Keskiarvo	PSA:n ja H117-Fab:n määrä
3486 3126 3382	3331	0 ng/ml PSA, 10 ng/kuoppa H117:aa
41852 35292 46794	41313	0,1 ng/ml PSA, 10 ng/kuoppa H117:aa
2854 2644 4028	3175	0 ng/ml PSA, 30 ng/kuoppa H117:aa
33563 40579 54735	42959	0,1 ng/ml PSA, 30 ng/kuoppa H117:aa
2435 2996 2510	2647	0 ng/ml PSA, 100 ng/kuoppa H117:aa
35852 46059 34942	38951	0,1 ng/ml PSA, 100 ng/kuoppa H117:aa
2521 1739 3059	2440	0 ng/ml PSA, 300 ng/kuoppa H117:aa
45761 32547 33164	37157	0,1 ng/ml PSA, 300 ng/kuoppa H117:aa

Puskurin vaikutus signaaliin. Biotinoloitua vasta-ainetta H117 oli 30 ng/kuoppa ja Eu-leimattuja, 5A10-päällystettyjä nanopalloja oli $6 \cdot 10^7$ kpl/kuoppa.

Fluoresenssi	Keskiarvo	PSA:n määrä ja käytetty puskuri
10557 8385 9101	9348	0 ng/ml PSA, ArcDian puskuri
7507913 6846108 7516152	7290058	10 ng/ml PSA, ArcDian puskuri
2176 2596 2916	2563	0 ng/ml PSA, Innotracs Solution Buffer
7829161 8597964 10795285	9074137	10 ng/ml PSA, Innotracs Solution Buffer
6146 6196 5815	6052	0 ng/ml PSA, Delfia [®] Assay Buffer
9024548 8936299 9168443	9043097	10 ng/ml PSA, Delfia [®] Assay Buffer

Mediumin määrän vaikutus signaaliin. mediuimeina käytettiin puhdasta DMEM + 10 % iFBS + penisilliini/streptomysiini + L-glutamiini sekä RPMI-1640, jossa oli L-glutamiinia + 15 % iFBS + penisilliini/streptomysiini + 1 mM natriumpuryvaattia + 10 mM Hepes. Biotinoidun vasta-aineen H117 pitoisuus oli 30 ng/kuoppa ja , Eu-leimattuja, 5A10-päällystettyjä nanopalloja oli $3 \cdot 10^8$ kpl/kuoppa.

Fluoresenssi	Keskiarvo	PSA:n ja mediumin määrä
31162 36539	33851	0 ng/ml PSA, 0 % RPMI-meediumia
394230 313546	353888	0,1 ng/ml PSA, 0 % RPMI-meediumia
70197 64240	67219	0 ng/ml PSA, 10 % RPMI-meediumia
343341 406037	374689	0,1 ng/ml PSA, 10 % RPMI-meediumia
123711 107744	115728	0 ng/ml PSA, 25 % RPMI-meediumia
476779 396141	436460	0,1 ng/ml PSA, 25 % RPMI-meediumia
175351 157919	166635	0 ng/ml PSA, 50 % RPMI-meediumia
604871 505482	555177	0,1 ng/ml PSA, 50 % RPMI-meediumia
696823 523699	610261	0 ng/ml PSA, 100 % RPMI-meediumia
907803 1055062	981433	0,1 ng/ml PSA, 100 % RPMI-meediumia
39009 30874	34942	0 ng/ml PSA, 0 % DMEM-meediumia
478079 549661	513870	0,1 ng/ml PSA, 0 % DMEM-meediumia
53187 47082	50135	0 ng/ml PSA, 10 % DMEM-meediumia
421446 349139	385293	0,1 ng/ml PSA, 10 % DMEM-meediumia
78161 82831	80496	0 ng/ml PSA, 25 % DMEM-meediumia
363152 276213	319683	0,1 ng/ml PSA, 25 % DMEM-meediumia
123915 105510	114713	0 ng/ml PSA, 50 % DMEM-meediumia
380489 416540	398515	0,1 ng/ml PSA, 50 % DMEM-meediumia
269454 395546	332500	0 ng/ml PSA, 100 % DMEM-meediumia
629029 493130	561080	0,1 ng/ml PSA, 100 % DMEM-meediumia

Solumäärän vaikutus signaaliin. Biotinoloidun vasta-aineen H117 määrä oli 30 ng/kuoppa ja 5A10-päällystettyjen, Eu-leimattujen nanopallojen määrä oli $3 \cdot 10^8$ kpl/kuoppa. Kontrollina käytettiin solulinjaa A549 ja varsinainen solulinja, jota tutkittiin, oli LnCap.

Fluoresenssi	Keskiarvo	PSA:n ja solujen määrä
21798 22022	21910	0/ml A549-soluja, PSA 0 ng/ml
450963 337679	394321	0/ml A549-soluja, PSA 0,1 ng/ml
66027 59880	62954	89,5 E2 /ml A549-soluja, PSA 0 ng/ml
407717 459003	433360	89,5 E2 /ml A549-soluja, PSA 0,1 ng/ml
406427 356762	381595	89,5 E3 /ml A549-soluja, PSA 0 ng/ml
783234 846406	814820	89,5 E3 /ml A549-soluja, PSA 0,1 ng/ml
3782336 3547370	3664853	89,5 E4 /ml A549-soluja, PSA 0 ng/ml
2066730 1430559	1748645	89,5 E4 /ml A549-soluja, PSA 0,1 ng/ml
5615906 2491992	4053949	89,5 E5 /ml A549-soluja, PSA 0 ng/ml
2350391 15470675	8910533	89,5 E5 /ml A549-soluja, PSA 0,1 ng/ml
13927559 12607543	13267551	89,5 E6 /ml A549-soluja, PSA 0 ng/ml
6457920 8039585	7248753	89,5 E6 /ml A549-soluja, PSA 0,1 ng/ml
180008 97602	138805	0/ml LNCap-soluja, PSA 0 ng/ml
421242 337480	379361	0/ml LNCap-soluja, PSA 0,1 ng/ml
77987 68550	73269	89,5 E2 /ml LNCap-soluja, PSA 0 ng/ml
586254 405140	495697	89,5 E2 /ml LNCap-soluja, PSA 0,1 ng/ml
150231 150139	150185	89,5 E3 /ml LNCap-soluja, PSA 0 ng/ml
1294271 1322750	1308511	89,5 E3 /ml LNCap-soluja, PSA 0,1 ng/ml
4342979 1359243	2851111	89,5 E4 /ml LNCap-soluja, PSA 0 ng/ml
15568111 10080055	12824083	89,5 E4 /ml LNCap-soluja, PSA 0,1 ng/ml
13167634 13973365	13570500	89,5 E5 /ml LNCap-soluja, PSA 0 ng/ml
14791489 13545656	14168573	89,5 E5 /ml LNCap-soluja, PSA 0,1 ng/ml
17301743 16164483	16733113	89,5 E6 /ml LNCap-soluja, PSA 0 ng/ml
16512417 17220560	16866489	89,5 E6 /ml LNCap-soluja, PSA 0,1 ng/ml

LnCap-solujen mediumin (RPMI-1640-mediumissa, jossa oli mukana L-glutamiinia + 15 % iFBS + penisilliini/streptomysiini + 1 mM natriumpuryvaattia + 10 mM Hepesta) standardit ja näytteet sekä kontrollisolujen A549-solujen (RPMI-1640, jossa oli L-glutamiinia + 10 % iFBS + penisilliini/streptomysiini) standardit ja näytteet. Biotinoidun vasta-aineen H117 määrä oli 30 ng/kuoppa ja 5A10-päällystettyjen, Eu-leimattujen nanopallojen määrä oli $3 \cdot 10^8$ kpl/kuoppa.

Fluoresenssi	Keskiarvo	PSA- ja mediumpitoisuus
53248 807072	430160	20% kontrollimeediumi, 0 ng/ml PSA
215072 3315436	1765254	20% kontrollimeediumi, 0,01 ng/ml PSA
2059465 2631446	2345455,5	20% kontrollimeediumi, 0,1 ng/ml PSA
11801143 6700275	9250709	20% kontrollimeediumi, 1 ng/ml PSA
18149969 17823687	17986828	20% kontrollimeediumi, 10 ng/ml PSA
199886 99829	149857,5	50% kontrollimeediumi, 0 ng/ml PSA
183318 611506	397412	50% kontrollimeediumi, 0,01 ng/ml PSA
844707 6356721	3600714	50% kontrollimeediumi, 0,1 ng/ml PSA
6973788 3898693	5436240,5	50% kontrollimeediumi, 1 ng/ml PSA
17234997 17828671	17531834	50% kontrollimeediumi, 10 ng/ml PSA
73956 78530	76243	20% kontrollimeediumi, A549-näyte
139961 286472	213216,5	50% kontrollimeediumi, A549-näyte
423421 183056	303238,5	20% LNCap-mediumi, 0 ng/ml PSA
484057 1359217	921637	20% LNCap-mediumi, 0,01 ng/ml PSA
1121033 4104935	2612984	20% LNCap-mediumi, 0,1 ng/ml PSA
7219825 9652683	8436254	20% LNCap-mediumi, 1 ng/ml PSA
18776513 17614902	18195707,5	20% LNCap-mediumi, 10 ng/ml PSA
256349 384561	320455	50% LNCap-mediumi, 0 ng/ml PSA
304124 183305	243714,5	50% LNCap-mediumi, 0,01 ng/ml PSA
679514 889424	784469	50% LNCap-mediumi, 0,1 ng/ml PSA
4928396 4929617	4929006,5	50% LNCap-mediumi, 1 ng/ml PSA
17452572 17720954	17586763	50% LNCap-mediumi, 10 ng/ml PSA
19829867 19504138	19667002,5	20% LNCap-mediumi näyte
19544327 19741136	19642731,5	50% LNCap-mediumi näyte

LnCap-solujen mediumin (RPMI-1640-mediumissa, jossa oli mukana L-glutamiinia + 15 % iFBS + penisilliini/streptomysiini + 1 mM natriumpuryvaattia + 10 mM Hepesta) standardit ja näytteet sekä kontrollisolujen A549-solujen (RPMI-1640, jossa oli L-glutamiinia + 10 % iFBS + penisilliini/streptomysiini) standardit ja näytteet. Vasta-aineen H117 määrä oli 30 ng/kuoppa ja Eu-leimattuja nanopalloja oli $3 \cdot 10^7$ kpl/kuoppa.

Fluoresenssi	Keskiarvo	PSA:n määrä ja mediumi
500 586 742	609	0 ng/ml, 20% kontrollimediumi
1928 1249 3086	2088	0,01 ng/ml, 20% kontrollimediumi
16137 14448 18034	16206	0,1 ng/ml, 20% kontrollimediumi
138135 125136 218376	160549	1 ng/ml, 20% kontrollimediumi
790486 406569 747015	648023	10 ng/ml, 20% kontrollimediumi
764 1051 844	886	A549-näyte, kontrolli
457 547 397	467	0 ng/ml, 20% LnCap-mediumi
2383 2021 3318	2574	0,01 ng/ml, 20% LnCap-mediumi
27375 15215 18699	20430	0,1 ng/ml, 20% LnCap-mediumi
119789 175134 121731	138885	1 ng/ml, 20% LnCap-mediumi
495537 586393 763161	615030	10 ng/ml, 20% LnCap-mediumi
496829 649210 608397	584812	LnCap-näyte, 1/10 -laimennos
107471 113964 89145	103527	LnCap-näyte, 1/100 -laimennos

Vasta-aineen H117 ja 5A10 määrän optimointi.

Partikkelimäärä	bioaff	bioaff (tausta)	H117:n, PSA:n ja 5A10:n määrä
27 30	1655.6 1514.8	1615.96 1590.01	1 ng H117, 0 ng/ml PSA, 30 ng 5A10
27 25	1710.2 1629.8	1613.07 1616.26	1 ng H117, 1 ng/ml PSA, 30 ng 5A10
23 20	1506.8 1537.8	1585.33 1570.94	3 ng H117, 0 ng/ml PSA, 30 ng 5A10
22 30	1585.6 1379.3	1563.21 1538.95	3 ng H117, 1 ng/ml PSA, 30 ng 5A10
27 27	1578.0 1501.2	1554.58 1586.96	10 ng H117, 0 ng/ml PSA, 30 ng 5A10
23 22	1588.9 1714.2	1578.12 1619.72	10 ng H117, 1 ng/ml PSA, 30 ng 5A10
23 29	1433.2 1770.1	1545.77 1703.15	30 ng H117, 0 ng/ml PSA, 30 ng 5A10
37 40	1621.8 893.4	1662.87 911.09	30 ng H117, 1 ng/ml PSA, 30 ng 5A10
29 28	118.5 103.6	104.01 82.39	3 ng H117, 0 ng/ml PSA, 1 ng 5A10
32 31	100.5 110.6	82.13 85.20	3 ng H117, 1 ng/ml PSA, 1 ng 5A10
20 28	422.4 437.2	291.20 336.15	3 ng H117, 0 ng/ml PSA, 3 ng 5A10
39 21	223.9 216.5	192.02 220.66	3 ng H117, 1 ng/ml PSA, 3 ng 5A10
25 29	601.9 586.6	557.00 488.97	3 ng H117, 0 ng/ml PSA, 10 ng 5A10
29 34	588.0 620.6	549.57 533.70	3 ng H117, 1 ng/ml PSA, 10 ng 5A10
23 40	5065.8 7051.1	5011.81 6792.41	3 ng H117, 0 ng/ml PSA, 100 ng 5A10
26 24	5507.6 5869.8	5187.77 5144.19	3 ng H117, 1 ng/ml PSA, 100 ng 5A10

Mikropallojen, joihin vasta-aine H117 oli kiinnitetty suoraan, toiminnan testaus. Mikropalloja oli jokaisessa kuopassa $5 \cdot 10^4$ kpl ja BF530-leimattua vasta-ainetta oli 3 ng jokaisessa kuopassa.

Partikkelimäärä	bioaff	bioaff (tausta)	Keskiarvo	PSA:n määrä
36	219	172.7	222	0 ng/ml PSA
38	225	179.3		
37	231	179.4	253	0,1 ng/ml PSA
29	274	181.2		
37	661	181.7	641	1 ng/ml PSA
44	620	175.4		
43	3506	191.0	3764	10 ng/ml PSA
31	4021	194.9		
36	8840	197.2	9147	100 ng/ml PSA
37	9454	207.1		

Puskurin vaikutus signaaliin ja BF530-leimattujen nanopallojen määrä. Vastaineella H117 päällystettyjä mikropalloja käytettiin $5 \cdot 10^4$ kpl/kuoppa.

Partikkelimäärä	bioaff	bioaff (tausta)	Keskiarvo	PSA:n ja BF530-leimattujen nanopallojen määrä
29 35 21	719,1 609,9 551,8	606.2 659.1 519.8	627	PSA 0 ng/ml, BF530-nanopallot 3E7 kpl Innotrac -puskuri
44 29 47	4251,8 4685,4 4909,8	598.3 647.8 653.1	4616	PSA 10 ng/ml, BF530-nanopallot 3E7 kpl Innotrac -puskuri
39 27 32	1549,5 1778,2 1403,7	1621.8 1460.7 1500.0	1577	PSA 0 ng/ml, BF530-nanopallot 1E8 kpl Innotrac -puskuri
58 49 35	28621,7 30629,3 38020,2	1474.9 1484.6 1595.7	32424	PSA 10 ng/ml, BF530-nanopallot 1E8 kpl Innotrac -puskuri
39 41 18	2997,4 2586,1 1826,0	2840.9 2596.1 2609.9	2470	PSA 0 ng/ml, BF530-nanopallot 3E8 kpl Innotrac -puskuri
32 26 42	57374,3 66671,9 68512,2	2405.4 2506.6 2481.2	64186	PSA 10 ng/ml, BF530-nanopallot 3E8 kpl Innotrac -puskuri
47 45 59	10969,7 9686,7 10107,0	11093.0 10211.1 11015.1	10254	PSA 0 ng/ml, BF530-nanopallot 1E9 kpl Innotrac -puskuri
49 38 45	127272,2 121925,9 114296,8	11486.6 11506.6 11098.6	121165	PSA 10 ng/ml, BF530-nanopallot 1E9 kpl Innotrac -puskuri
43 47 39	328,5 461,6 423,1	358.0 359.3 359.4	404	PSA 0 ng/ml, BF530-nanopallot 3E7 kpl ArcDia -puskuri
43 60 50	23596,6 22210,4 28909,2	373.3 368.5 356.4	24905	PSA 10 ng/ml, BF530-nanopallot 3E7 kpl ArcDia -puskuri
50 60 39	916,5 1158,3 1286,4	1069.2 1175.1 1206.1	1120	PSA 0 ng/ml, BF530-nanopallot 1E8 kpl ArcDia -puskuri
49 55 37	76961,8 76468,2 77162,7	1224.8 1303.3 1139.1	76864	PSA 10 ng/ml, BF530-nanopallot 1E8 kpl ArcDia -puskuri

60	2673,9	2847.2	2912	PSA 0 ng/ml, BF530-nanopallot 3E8 kpl ArcDia -puskuri
52	3335,4	2848.5		
53	2725,2	2851.6		
49	127721,4	3010.5	125452	PSA 10 ng/ml, BF530-nanopallot 3E8 kpl ArcDia -puskuri
48	121234,0	3295.6		
43	127400,7	3073.8		
58	10106,4	10265.0	10541	PSA 0 ng/ml, BF530-nanopallot 1E9 kpl ArcDia -puskuri
60	11333,6	11122.9		
54	10181,8	10718.4		
52	140840,7	10950.4	140610	PSA 10 ng/ml, BF530-nanopallot 1E9 kpl ArcDia -puskuri
54	140691,5	10979.3		
64	140299,0	11042.6		

TPX-menetelmän kinetiikka, kun käytettiin BF530-leimattua vasta-ainetta 3 ng/kuoppa. Vasta-aineella H117 päällystettyjä mikropalloja oli $5 \cdot 10^4$ kpl/kuoppa.

Aika (min)	Partikkelimäärä	bioaff	bioaff (tausta)	Keskiarvo	PSA:n määrä
0	52	173,2	131.5	180	0 ng/ml
	58	186	138.0		
	47	315,3	146.9	308	1 ng/ml
	48	301,2	130.7		
6	32	193,1	143.7	196	0 ng/ml
	43	197,9	139.6		
	62	431,5	143.0	412	1 ng/ml
	36	392,9	147.8		
12	59	207,9	139.4	197	0 ng/ml
	55	186,6	139.4		
	53	540,4	145.9	519	1 ng/ml
	53	498,4	153.3		
18	41	215,6	147.6	193	0 ng/ml
	56	171,1	136.0		
	33	553,8	140.2	645	1 ng/ml
	53	736,1	187.1		
24	54	191,6	154.9	186	0 ng/ml
	61	181	137.3		
	59	597,2	141.4	643	1 ng/ml
	55	688,4	207.0		
30	51	205,3	156.1	204	0 ng/ml
	61	203,1	134.2		
	45	640,2	143.0	677	1 ng/ml
	45	714	199.6		
36	52	220,6	155.1	202	0 ng/ml
	48	183,1	142.6		
	65	726,2	144.8	749	1 ng/ml
	55	771,2	224.0		
42	54	221,1	154.2	212	0 ng/ml
	62	202,3	140.6		
	47	739,8	155.2	820	1 ng/ml
	48	900,7	216.1		
48	50	208	151.6	206	0 ng/ml
	64	203,6	135.4		
	38	828,1	151.9	864	1 ng/ml
	63	899,4	225.6		
54	52	248,9	158.6	212	0 ng/ml
	46	175,4	139.7		
	41	784,4	137.4	797	1 ng/ml
	60	809	234.1		

60	51	202,3	157.7	209	0 ng/ml
	51	215,7	145.3		
	57	786,5	145.4	853	1 ng/ml
	61	918,8	236.0		
66	58	217	160.7	207	0 ng/ml
	46	197,6	138.7		
	48	741,6	149.9	864	1 ng/ml
	54	985,4	244.1		
72	47	250,7	161.2	229	0 ng/ml
	42	207,1	143.8		
	45	822,8	148.5	861	1 ng/ml
	48	898,2	249.0		
78	58	247,2	157.7	226	0 ng/ml
	46	205,3	145.3		
	48	830,3	145.4	866	1 ng/ml
	54	902,5	236.0		
84	51	231,9	161.2	217	0 ng/ml
	51	202,3	142.9		
	57	842,3	153.2	870	1 ng/ml
	61	897,6	236.1		

TPX-menetelmän kinetiikka, kun käytettiin BF530-leimattuja nanopalloja $5 \cdot 10^7$ kpl/kuoppa. Vasta-aineella H117 päällystettyjä mikropalloja oli $5 \cdot 10^4$ kpl/kuoppa.

Aika (min)	Partikkelimäärä	bioaff	bioaff (tausta)	Keskiarvo	PSA:n määrä
0	47	834,5	966.3	867	0 ng/ml
	53	899	933.1		
	52	1475,8	961.0	1632	1 ng/ml
	57	1787,4	1004.2		
6	41	962,3	997.7	959	0 ng/ml
	55	955,2	927.9		
	52	4328,2	984.6	4383	1 ng/ml
	50	4438	1027.3		
12	39	982,4	974.2	912	0 ng/ml
	35	842,2	954.0		
	44	5835	984.5	6145	1 ng/ml
	57	6454,5	1032.6		
18	51	928,8	1028.6	993	0 ng/ml
	50	1056,4	952.7		
	49	8886,3	979.7	9748	1 ng/ml
	62	10610,4	1026.2		
24	51	919,6	1061.4	882	0 ng/ml
	50	844,3	913.0		
	58	13072,8	996.4	12496	1 ng/ml
	69	11918,8	1044.8		
30	50	1036,1	1017.5	851	0 ng/ml
	63	665,8	916.3		
	45	12259,3	957.1	13161	1 ng/ml
	58	14061,9	1003.9		
36	68	1189	1069.0	1052	0 ng/ml
	47	915,5	931.4		
	36	15019,4	949.8	15982	1 ng/ml
	55	16945,2	1053.3		
42	60	1150	1091.6	1033	0 ng/ml
	52	915,7	959.8		
	48	17639	987.6	17484	1 ng/ml
	78	17329,7	1074.9		
48	58	1138	1092.1	958	0 ng/ml
	48	777,9	907.6		
	57	16687	964.2	17670	1 ng/ml
	56	18652,7	1119.9		
54	57	1503,8	1078.3	1170	0 ng/ml
	54	836,1	934.7		
	52	19832	918.7	19494	1 ng/ml
	63	19155,7	1070.0		

60	49	1988,7	1077.6	1425	0 ng/ml
	62	860,3	931.4		
	55	21963,1	1013.0	20453	1 ng/ml
	49	18942,1	1051.4		
66	43	1657,8	1025.3	1242	0 ng/ml
	43	825,8	938.0		
	57	22490,4	971.3	21362	1 ng/ml
	56	20232,6	1101.7		
72	45	2750,1	1078.5	1850	0 ng/ml
	59	950,5	950.2		
	65	24938	1032.7	23874	1 ng/ml
	64	22810,1	1039.1		
78	56	1857,1	1015.3	1405	0 ng/ml
	61	952,6	943.2		
	68	24793,5	1023.3	23865	1 ng/ml
	59	22936,7	1030.5		
84	57	1796,6	1062.4	1411	0 ng/ml
	54	1024,7	968.6		
	52	24939,2	1029.2	23884	1 ng/ml
	63	22828,5	986.9		
90	65	2563,4	1083.6	1763	0 ng/ml
	59	962,7	938.7		
	68	25036,0	1037.4	24301	1 ng/ml
	63	23565,8	1067.9		

TPX-menetelmän standardit ja LnCap-solunäyte (20% mediumia). Mediumina käytettiin RPMI-1640-mediumia. LnCap-solujen mediumi oli RPMI-1640-mediumia, jossa oli mukana L-glutamiinia + 15 % iFBS + penisilliini/streptomysiini + 1 mM natriumpuryvaattia + 10 mM Hepesta. Vasta-aineella H117 päällystettyjä mikropalloja käytettiin $5 \cdot 10^4$ kpl/kuoppa ja BF530-leimattuja nanopalloja $5 \cdot 10^7$ kpl/kuoppa.

Partikkelimäärä	bioaff	bioaff (tausta)	Keskiarvo	PSA:n määrä
40	526,6	786.9	553,0	0 ng/ml
50	602,2	724.2		
56	530,2	768.5		
58	270,1	171.9	270,1	0,01 ng/ml
95	0 del	0.0		
46	749,4	741.7	723,2	0,1 ng/ml
49	697,0	703.7		
55	815,0	746.3	860,7	0,3 ng/ml
44	936,9	747.1		
40	830,2	747.6		
58	1574,2	761.5	1835,2	1 ng/ml
48	1754,4	751.6		
48	2176,9	759.4		
58	4195,3	775.6	4632,4	3 ng/ml
33	4513,2	629.9		
45	5188,8	745.0		
54	11272,8	796.4	11262,9	10 ng/ml
36	12332,5	755.8		
65	10183,4	692.9		
54	25024,7	855.5	26936,2	30 ng/ml
44	25657,1	733.0		
33	30126,8	962.8		
52	16794,2	750.1	20318,6	LnCap 1/5-laimennos
41	19291,5	907.3		
40	24870,2	896.8		